

Pflanzenbiologisch-biochemische Grundlagen zur pharmazeutischen Nutzung
der Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.)

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Maik Uwe Kleinwächter
aus Helmstedt

1. Referent:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Druckjahr 2008

apl. Professor Dr. Dirk Selmar

Professor Dr. Peter Winterhalter

05.11.2007

21.12.2007

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Matallana L., Kleinwächter M. & Selmar D. Sulfur is limiting the glucosinolate accumulation in nasturtium *in vitro* plants (*Tropaeolum majus* L.)
J. Applied Botany and Food Quality 80: 1-5 (2006).

Kleinwächter, M., Kramer, D., Selmar, D. et al. Glucosinolat-reiche Kapuzinerkresse in der landwirtschaftlichen Nutzung: Entwicklung von *in vitro*-Vermehrungsverfahren zur Herstellung großer Mengen genetisch identischer *Tropaeolum majus*-Pflanzen mit hohem Gehalt an Glucosinolaten
Schlussbericht des FNR-Projektes FKZ: 22018101 (2007).

Tagungsbeiträge

Kleinwächter M., Bloem E., Haneklaus, S., Schnug E. & Selmar D. The glucosinolate content of nasturtium (*Tropaeolum majus*) is affected by both genetic and environmental factors (Poster) 21-05. Botanikertagung, Braunschweig (2004).

Kleinwächter M., Thiele J., Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. & Selmar D. Variability of glucosinolate content and myrosinase activity in the medicinal plant *Tropaeolum majus* (Vortrag) 42. The First International Conference on Glucosinolates, Jena (2006).

Bloem E., Haneklaus S., Thiele J., Kleinwächter M., Selmar D. & Schnug E. Influence of cultivation and post-harvest treatments on the glucotropaeolin content of *Tropaeolum majus* (Poster) 16-02. The First International Conference on Glucosinolates, Jena (2006).

Matallana L., Kleinwächter M., Grotkass C., Hutter I., Kramer D. & Selmar D. Sulfur limited accumulation of glucotropaeolin in *Tropaeolum majus in vitro*-plants (Poster) 19. The First International Conference on Glucosinolates, Jena (2006).

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dirk Selmar, dem Mentor meiner Arbeit, der mich über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit stets hervorragend unterstützt hat und mir in allen Höhen und Tiefen des „Wissenschaftlerlebens“ immer tatkräftig zur Seite gestanden hat.

Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter möchte ich meinen Dank aussprechen, zum einen für die Übernahme des Korreferates und zum anderen dafür, dass ich die HPLC/MS des Institutes für Lebensmittelchemie für die Analysen der Guttationsflüssigkeiten nutzen konnte. Für die hervorragende Betreuung während der Durchführung dieser Arbeiten danke ich Herrn Dr. Gerold Jerz sehr. Und bei Frau Saskia Eichhorn bedanke ich mich für die zahlreichen weiterführenden Diskussionen auf dem Gebiet der Glucosinolat-Analytik.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ewald Schnug, Frau Dr. Silvia Haneklaus, Frau Dr. Elke Mareke Bloem und Frau Juliane Thiele vom Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL möchte ich mich herzlich bedanken: Die Kooperation mit den „Schnugs“ machte das *Tropaeolum*-Projekt in dieser Form und Größe erst möglich. An dieser Stelle richtet sich mein Dank aber auch an die zahlreichen Pflanz- und Erntehelfer, sowie an alle, die bei der Pflege der Versuchsfelder mitgeholfen haben.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Pflanzenbiologie möchte ich mich für jegliche Form der Unterstützung und für die tagtägliche Kollegialität bedanken. Bei Frau Lilian Matallana und Frau Daniela Kramer möchte ich mich für die Arbeiten mit den *in vitro*-Kulturen von *Tropaeolum* bedanken, mit reichlich Dank bedacht seien aber auch meine Kollegen - bzw. ehemaligen Kollegen - Herr Dr. Gerhard Bytof, Herr Dr. Sven Knopp, Herr Björn Breitenstein, Frau Sabine Selmar und Frau Maria Hellmund. Frau Antje Bettermann möchte ich insbesondere für die Durchführung der Rechtschreibkorrekturen danken.

Der Firma Dreluso Pharmazeutika GmbH, Hessisch-Oldendorf, danke ich für die finanzielle Unterstützung im Vorlauf des FNR-Projektes - von der Firma Dreluso kam die Initialzündung für die im Laufe des letzten Jahrzehntes durchgeführten Arbeiten an der Kapuzinerkresse. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Holger Elten, Herrn Dr. Thomas Köhler und Herrn Dr. Martin Diefenbach für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Michael Kraft, Herrn Thorsten Marschall und den anderen Mitarbeitern des Botanischen Gartens gebührt mein Dank für den Anbau der Kapuzinerkressenpflanzen des *screenings*. Ganz besonders möchte ich mich dafür bedanken, dass ich mich bei Euch mit meinen Anliegen jederzeit willkommen fühlen durfte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Dr. Victor Wray vom Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die durchgeführten Strukturaufklärungen mit der Kernresonanzspektroskopie.

Frau Dr. Carolin Schneider und Frau Imke Hutter von der Firma Institut für Pflanzenkultur in Schnega danke ich für die hervorragende Kooperation - meine größte Achtung gilt Eurem Mut zur Firmengründung.

„Last but not least“ möchte ich meinen Eltern Brigitte und Kurt Kleinwächter, meinem Bruder Uwe Kleinwächter, meiner lieben Freundin Gesa, meinen Freunden, Mitbewohnern und all meinen Gönnern danken, dank Eurer Unterstützung, Eurem Verständnis und auch Nachsicht ist diese Arbeit erst möglich geworden: Vielen Dank für alles.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden mit der finanziellen Unterstützung der Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) im Rahmen des Forschungsvorhabens FKZ: 22018101 durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	- 1 -
1.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte.....	- 1 -
1.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte	- 7 -
2 Das Glucosinolat-Myrosinase-System - ein Literaturüberblick.....	- 9 -
2.1. Glucosinolate - eine besondere Gruppe pflanzlicher Naturstoffe.....	- 9 -
2.1.1 Chemische Struktur	- 9 -
2.1.2 Vorkommen	- 11 -
2.1.3. Biosynthese.....	- 12 -
2.1.4. Regulation des Glucosinolat-Stoffwechsels.....	- 16 -
2.2 Thioglucosylhydrolasen - Myrosinasen.....	- 19 -
2.2.1 Klassifizierung	- 19 -
2.2.2 Vorkommen	- 19 -
2.2.3 Physikochemische Eigenschaften	- 20 -
2.2.4 Myrosinase-Isoformen	- 22 -
2.2.5 Myrosinase-bindende und assoziierte Proteine	- 22 -
2.2.6 Molekulare Struktur der Myrosinasen	- 23 -
2.3 Kompartimentierung und Stoffwechsel	- 23 -
2.4 Hydrolyse der Glucosinolate	- 25 -
2.4.1 Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse.....	- 25 -
2.4.2 Bildung der Senföle	- 27 -
2.5 Bedeutungen des Glucosinolat-Myrosinase-Systems	- 30 -
2.5.1 Ökologische Aspekte	- 30 -
2.5.2 Wachstumsregulation	- 32 -
2.5.3 Glucosinolathaltige Pflanzen in der Nutzung durch den Menschen	- 33 -
2.6 Transport der Glucosinolate	- 36 -
2.7 Die Evolution des Glucosinolat-Myrosinase-Systems	- 38 -
2.8 Die Kapuzinerkresse - eine in vielerlei Hinsicht beachtenswerte Pflanze.....	- 40 -
3 Zielsetzungen dieser Arbeit.....	- 43 -
3.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte.....	- 43 -
3.1.1 Vorgehensweise.....	- 43 -
3.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte	- 44 -
3.2.1 Vorgehensweise.....	- 44 -
4 Ergebnisse und Diskussion	- 46 -
4.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte.....	- 46 -
4.1.1 <i>Screening</i> : Ascorbinsäure-Gehalte - Aktivierungsstatus der Myrosinase ..	- 47 -
4.1.2 <i>Screening</i> : Myrosinase-Aktivitäten	- 48 -
4.1.3 <i>Screening</i> : Glucotropaeolin-Gehalte	- 50 -
4.1.3.1 Altersspezifische Gehalts-Unterschiede	- 50 -
4.1.3.2 Gehalte in voll entwickelten Blättern	- 52 -
4.1.3.3 Glucosinolat-Gehalte der Einzelpflanzen	- 53 -
4.1.3.3.1 Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge (gefriergetrocknet).....	- 54 -
4.1.3.3.2 Glucosinolat -Gehalte in der Trockendroge (Ofen getrocknet).....	- 55 -
4.1.3.3.3 Individuelle Trocknungsverluste an Glucotropaeolin.....	- 56 -
4.1.3.4 Korrelation Trocknungsverlust/Myrosinase-Aktivität.....	- 57 -
4.1.4 <i>Screening</i> : Auswahl der Pflanzen für die <i>in vitro</i> -Kultur	- 58 -

4.1.5 Stammerhaltung: <i>in vitro</i> -Kultur der Kapuzinerkresse	- 62 -
4.1.5.1 Glucosinolat-Gehalte in den <i>in vitro</i> -Pflanzen	- 63 -
4.1.5.2 Einfluss des Sulfat-Gehaltes im Medium auf den GTL-Gehalt	- 65 -
4.1.5.2 Massenvermehrung der Kapuzinerkresse	- 69 -
4.1.6 Pilotproduktion: die Regenerate im Feldversuch	- 71 -
4.1.6.1 Glucotropaeolin-Gehalte in den Regeneraten	- 73 -
4.1.6.1.1 Variationsbreite der GTL-Gehalte in den Regeneraten	- 73 -
4.1.6.1.2 Vergleich der GTL-Gehalte "Mutterpflanzen"/Regenerate	- 75 -
4.1.6.1.3 GTL-Gehalte der Regenerate in den einzelnen Anbaujahren	- 76 -
4.1.6.1.4 Mittlere GTL-Gehalte der einzelnen Varietäten	- 78 -
4.1.6.1.5 GTL-Gehalte in den Pflanzen einer Saatgutmischung	- 78 -
4.1.6.1.6 Vergleich der GTL-Gehalte der Regenerate/Saatgutmischung	- 79 -
4.1.7 Beurteilung der gewählten Züchtungsstrategie	- 81 -
4.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte	- 82 -
4.2.1 Nachweis apoplastischer Myrosinase-Aktivität	- 82 -
4.2.2 Suche nach Glucotropaeolin-Glucosiden in <i>Tropaeolum</i>	- 86 -
4.2.2.1 Analysen der Guttationsflüssigkeit	- 86 -
4.2.2.2 Analysen von Nektar	- 92 -
4.2.2.3 Analysen der apoplastischen Waschflüssigkeiten	- 95 -
4.2.4 Glucotropaeolin-Glucoside - eine neue „alte“ Transportform?	- 96 -
4.2.5 Die ökologische Relevanz apoplasmatischer Glucosinolate	- 100 -
5 Zusammenfassung	- 106 -
5.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte	- 106 -
5.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte	- 108 -
6 Material und Methoden	- 110 -
6.1 Chemikalien	- 110 -
6.2. HPLC-Anlage	- 110 -
6.3 LC/MS-Apparatur	- 110 -
6.4 Sonstige Materialien	- 110 -
6.5 Pflanzenmaterialien	- 111 -
6.6 Anbaubedingungen und Probennahme	- 111 -
6.6.1 Pflanzen des <i>screenings</i>	- 111 -
6.6.2 Pflanzen im Feldanbau (FAL, Braunschweig)	- 111 -
6.7 <i>in vitro</i> -Kultur von <i>Tropaeolum majus</i>	- 112 -
6.8 Bestimmung von Ascorbinsäure-Gehalten	- 112 -
6.8.1. Prinzip der photometrischen Bestimmung	- 112 -
6.8.2 Extraktion von L-Ascorbinsäure	- 113 -
6.8.3 Photometrische Bestimmung	- 113 -
6.9 Bestimmung von Myrosinase-Aktivitäten	- 114 -
6.9.1 HPLC-Bestimmung von Glucose	- 114 -
6.9.2 Herstellung von Enzymrohextrakten	- 114 -
6.9.3 Inkubationen zur Aktivitätsbestimmung der Myrosinase	- 114 -
6.9.4. Derivatisierung der Proben	- 115 -
6.9.5 Chromatographie der Benzoylderivate	- 115 -
6.10 Bestimmung von Glucotropaeolin-Gehalten	- 116 -
6.10.1 Prinzip der HPLC-Bestimmung	- 116 -
6.10.2 Extraktion des Glucotropaeolins	- 116 -
6.10.3 Chromatographie des Glucotropaeolins	- 117 -
6.11 Gewinnung von Extrakten aus apoplastischer Waschflüssigkeit	- 117 -
6.11.1 Infiltration	- 117 -

6.11.2 Herstellung der Enzymextrakte	- 118 -
6.11.3 Extraktion der Glucoside.....	- 118 -
6.12 Schnelltest der Myrosinase-Aktivität	- 118 -
6.12.1 Prinzip der HPLC-Bestimmung von Benzylsenfölen.....	- 118 -
6.12.2 Myrosinase-Assay.....	- 119 -
6.12.3 Chromatographie von Benzylsenfölen	- 119 -
6.13 Bestimmung von Malatdehydrogenase-Aktivitäten.....	- 119 -
6.13.1 Prinzip der photometrischen Bestimmung von MDH-Aktivitäten.....	- 119 -
6.13.2 Malatdehydrogenase-Assay.....	- 120 -
6.14 LC/MS- <i>scan</i> nach Glucotropaeolin-Glucosiden.....	- 120 -
6.14.1 Herstellung von Extrakten aus Guttationsflüssigkeit	- 120 -
6.14.2 Herstellung von Extrakten aus Nektar.....	- 121 -
6.14.3 Chromatographie-Bedingungen	- 121 -
7 Literaturverzeichnis.....	- 122 -

Abkürzungsverzeichnis

BG	Bezeichnung für <i>in vitro</i> -Klone (Herkunft: Botanischer Garten Braunschweig)
EC	Enzyme Commission, in Verbindung mit entsprechenden Ziffern Klassifizierungsnummer für Enzyme
ESI	Electrospray Ionization
ESP	Epithiospecifizier Protein
FAL	Forschungsanstalt für Landwirtschaft
FG	Frischgewicht
FL	Bezeichnung für <i>in vitro</i> -Klone (Herkunft: Freiland, Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig))
FM	Fließmittel
GTL	Glucotropaeolin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC/MS	HPLC gekoppelt mit Massenspektrometer
IES	Indolessigsäure
LC	Liquid Chromatography, Flüssigkeitschromatographie
LR	Bezeichnung für <i>in vitro</i> -Klone (Herkunft: Institut für Pflanzenkultur, Schnega)
MBP	Myrosinase-bindende Proteine
MDH	Malatdehydrogenase
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Medium zur <i>in vitro</i> -Kultur nach Murashige und Skoog, 1962
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyAP	Myrosinase-assoziierte Proteine
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
PAPS	Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PMS	5-Methylphenaziniummethosulfat
QTL	Quantitative Trait Locus
rbcl	Gen der großen Untereinheit der Ribulosebisphosphatcarboxylase
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure

RP	Reversed Phase, Umkehrphase
RT	Retention Time, Retentionszeit
TDZ	1-Phenyl-3-(1,2,3-Thiadiazol-5-yl-urea
TFP	Thiocyanate-formende-Proteine
TG	Trockengewicht
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Temporary Immersion System, Temporäres Immersionssystem

1 Einleitung

1.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte

Pflanzliche Arzneimittel erfreuen sich einer stetig steigenden Beliebtheit in der deutschen Bevölkerung. Im Jahr 2005 beliefen sich die Ausgaben allein für die rezeptfreien Phytopharmaka in Apotheken auf rund 1,5 Milliarden Euro (Seidscheck, 2007a). Nach einer Studie des Instituts für Demoskopie Allensbach liegt der Hauptgrund für die wachsende Beliebtheit pflanzlicher Arzneimittel in der erhöhten Skepsis der Verbraucher gegenüber den Nebenwirkungen vieler chemisch-synthetischer Wirkstoffe (Seidscheck, 2007b).

In einer ganzen Reihe von Arzneipflanzen ist die pharmazeutische Wirkung auf die darin enthaltenen Glucosinolate zurückzuführen. Wer schon einmal frische Blätter oder Blüten der Kapuzinerkresse, Senf Saat, Rettich oder aber auch zum Beispiel frischen Meerrettich langsam im Mund zerkaut hat, der kennt die typische brennende Schärfe, die allerdings zeitlich verzögert eintritt und sich langsam vom Mundraum über den Rachen bis in die Nasennebenhöhlen ausbreitet. Unweigerlich beginnt die Nase zu laufen und die Augen zu tränen, so stark ist die Reizwirkung. Ursache dieser körperlichen Reaktionen sind in all diesen Fällen die aus den Pflanzenmaterialien freigesetzten Senföle. Diese kommen jedoch als solche in den entsprechenden Pflanzen nicht vor, sondern werden erst beim Kauen, also beim Zerkleinern der pflanzlichen Gewebe, aus einer Vorstufe, den Glucosinolaten, in einer postmortalen Reaktion enzymatisch gebildet. Deshalb tritt der Sinneseindruck der brennenden Schärfe auch erst einige Zeit nach dem Kauen mit einer leichten Verzögerung ein.

Bei den Glucosinolaten handelt es sich um Thioglucoside, speziell um eine sulfonierte Oxim-Einheit mit variablem Rest (R), die mit einer Thioglucose verestert ist (Abbildung 1). Im allgemeinen pflanzenwissenschaftlichen Sprachgebrauch wird diese Naturstoffgruppe häufig als Senfölglycoside bezeichnet. In den Geweben der glucosinolathaltigen Pflanzen finden sich hydrolytische Enzyme - die Myrosinasen (EC 3.2.1.147). Die Myrosinasen hydrolysieren die Glucosinolate und leiten die Freisetzung der Senföle ein. Glucosinolate und Myrosinasen liegen räumlich von einander getrennt in Membran umschlossenen Zellkompartimenten innerhalb der Gewebe vor. Wird die Integrität eines glucosinolathaltigen, pflanzlichen Gewebes gestört, z. B. beim Kauen, dann gelangen die Glucosinolate in Kontakt mit den hydrolytischen Myrosinasen. In vielen Fällen ist allerdings noch eine begleitende Aktivierung der Myrosinasen durch Ascorbinsäure notwendig (Kleinwächter und Selmar, 2004), bevor die enzymatische Hydrolyse der Glucosinolate stattfinden kann. Die bei der Abspaltung des glucosidischen Restes entstehenden Thiohydroximat-O-Sulfonate sind instabil und reagieren je nach den vorliegenden Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Verfügbarkeit von Enzymen und Ionen) unter Sulfatabspaltung zu unterschiedlichen Substanzen, so entsteht ein komplexes Gemisch an Folgeprodukten. Im Einzelnen handelt es sich hierbei in der Regel um die zu den in die Reaktion eingegangenen Glucosinolaten korrespondierenden Nitrile, Thiocyanate oder Isothiocyanate. Das Gemisch dieser verschiedenen auf den menschlichen Organismus reizend

wirkenden und brennend scharf schmeckenden Substanzen wird häufig vereinfacht unter dem Sammelbegriff Senföle zusammengefasst (Bones und Rossiter, 1996; Selmar, 1999; Bones und Rossiter, 2006; Halkier und Gershenzon, 2006).

Im ökologischen Kontext der glucosinolathaltigen Pflanzen handelt es sich bei der Freisetzung der Senföle mittels der Myrosinasen in erster Linie um eine Abwehrstrategie zur Abschreckung von Fraßfeinden und zur Bekämpfung von pflanzlichen Pathogenen, wie z.B. Bakterien und auch Pilzen, (Louda und Mole, 1991; Oleszek, 1995).

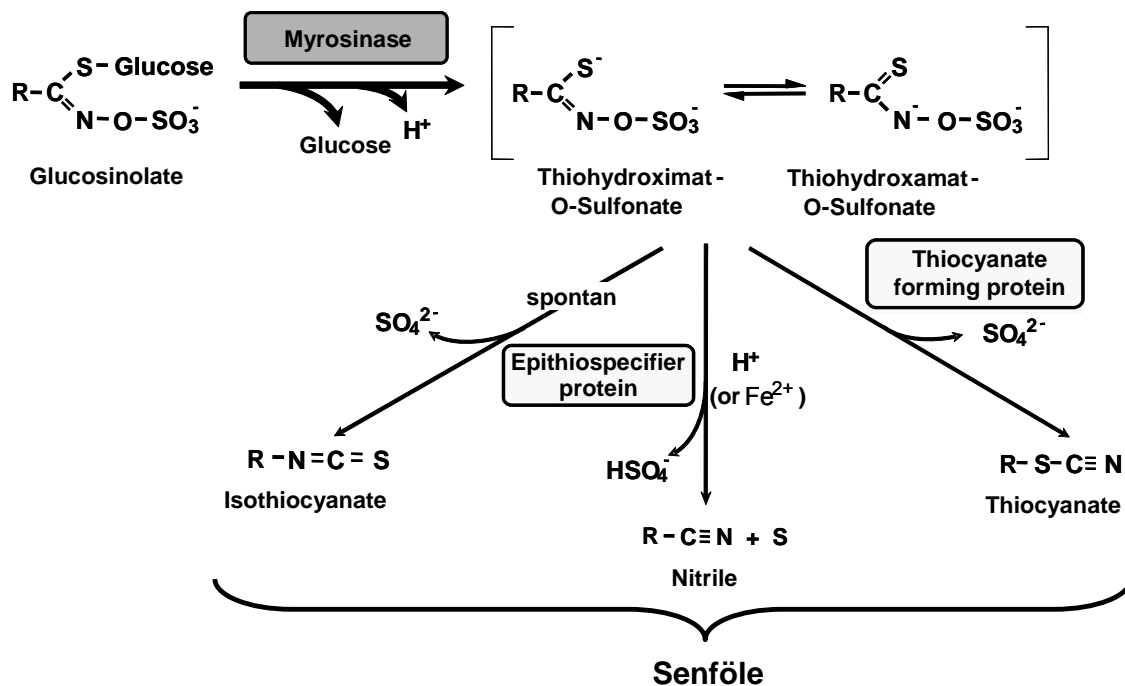


Abbildung 1: Bildung der Senföle

Im Zuge der Hydrolyse der Glucosinolate durch die Myrosinasen entstehen unter Glucoseabspaltung instabile Thiohydroximat-O-sulfonate und Thiohydroxamat-O-sulfonate, die je nach den vorliegenden Reaktionsbedingungen hauptsächlich zu Isothiocyanaten, Nitrilen oder Thiocyanaten, den so genannten Senfölen, weiter reagieren (Selmar, 1999).

Die bei uns in Mitteleuropa allgemein hin als Zierpflanze bekannte Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) ist ein wichtiger Vertreter in der Gruppe der glucosinolathaltigen Pflanzen. Sie enthält große Mengen an Glucotropaeolin, einem Glucosinolat mit einer Benzylgruppe als Seitenkette. Im Fall einer Gewebsverletzung wird sehr rasch antimikrobiell wirksames Benzylsenföl freigesetzt (z.B. Winter, 1952; Schaffer, 1980), das als Hauptkomponente vor allen das Benzylisothiocyanat enthält.

In der ursprünglichen Heimat der Kapuzinerkresse, der Region des tropischen Südamerikas im Bereich des heutigen Perus, Kolumbiens und Boliviens, haben die Menschen seit Jahrhunderten um die Wirkungen dieser Pflanze gewusst und nutzten sie in der traditionellen Volksmedizin, wie diese um 1570 entstandene Zeichnung (Abbildung 2) aus dem Kräuterbuch des Hernández, dem Leibarzt des damaligen spanischen Königs Philipp des II., eindrucksvoll belegt. Aus den dazugehörigen Aufzeichnungen geht hervor, dass die Inka die Kapuzinerkresse äußerlich bei Hautkrankheiten, Entzündungen und Verletzungen anwendeten (Wolters, 1999). Diese Indikationen erscheinen auch aus modernen, schulmedizinischen Gesichtspunkten durchaus nachvollziehbar.

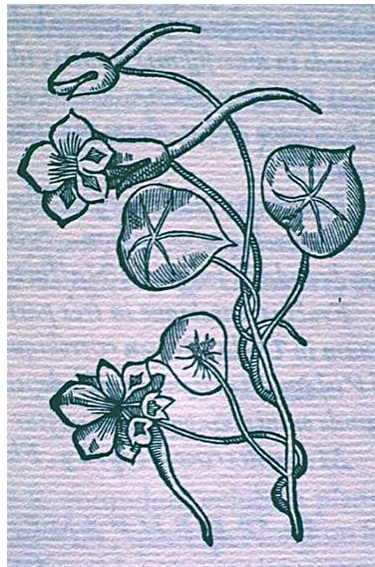


Abbildung 2: Zeichnung von Kapuzinerkresse aus dem Kräuterbuch des Hernández (um 1570)
(Wolters, 1999)

Heutzutage werden für die Kapuzinerkresse insbesondere die unterstützende Behandlung von bakteriellen Infektionen der ableitenden Harnwege und der Atemwege, sowie die äußere Anwendung bei leichten Muskelschmerzen hervorgehoben (Kommission E, 1992; Hänsel et al., 1994). Die ausgeprägte antibakterielle Wirkung im Urogenitaltrakt, die nach dem Verzehr des Kapuzinerkressekrauts zu beobachten ist, lässt sich anhand der Passage des Senföls durch den menschlichen Körper erklären:

Zunächst wird nach dem Zerkauen des Pflanzenmaterials das Benzylsenfö in Mund und Magen gebildet und gelangt passiv über das Dünndarmepithel in den menschlichen Körper. Hier kann allerdings auch direkt an Ort und Stelle die unverzügliche Ausscheidung und Entgiftung eingeleitet werden. Zunächst wird das Senfö an das Tripeptid Glutathion gebunden. Die dabei entstehenden Mercaptursäurederivate sind wesentlich hydrophiler und werden ausgeschieden. Der Mercaptursäureweg repräsentiert einen generellen Stoffwechselweg zur Entgiftung hydrophiler, niedermolekularer Fremdstoffen (Xenobiotica) des menschlichen Körpers. Über den Blutkreislauf gelangen die aus den

Senfölen gebildeten Merkaptursäurederivate in die Nieren und werden letztendlich über den Urogenitaltrakt ausgeschieden. Da unter den physiologischen Bedingungen im Harn stets ein gewisser Anteil des gebundenen Senföls durch Hydrolysen wieder freigesetzt wird, entfaltet sich im Bereich der ableitenden Harnwege die entzündungshemmende Wirkung des Kapuzinerkressekrauts (Mennicke et al., 1988).

Auf dem deutschen Arzneimittelmarkt sind schon seit längerem Phytopharmaka erhältlich, die Kapuzinerkresse in unterschiedlichen pharmazeutischen Zubereitungen enthalten. Hierzu zählt unter anderem auch das Urologikum Nephroselect® M der Firma DRELUSO Pharmazeutika. Hierbei handelt es sich um ein flüssiges Mischpräparat, das aus Kapuzinerkressepresssaft in Verbindung mit einigen anderen, wohl eher als diuretisch wirkend einzuordnenden, Kräuterauszügen in einem Ethanol-Wassergemisch besteht. Im Zuge der Herstellung dieses Medikamentes wird allerdings bereits während des Pressens des frischen Pflanzenmaterials der größte Teil Glucotropaeolin zu Benzylsenföls umgewandelt und im fertigen Präparat finden sich keine intakten Glucosinolate mehr. Ein großer Nachteil der Verwendung von freiem Benzylsenföls in pharmazeutischen Präparaten, besteht in dessen geringer Stabilität im Vergleich zum glucosidischen Glucotropaeolin. Das bedeutet, dass mit der Zeit die antibakterielle Wirkung von Nephroselect® M stark abnimmt und eine optimale Heilwirkung leider nicht mehr gewährleistet ist.

Aus diesem Problem heraus erwuchs der Wunsch ein neues, qualitativ hochwertigeres und haltbareres Urologikum auf der Basis von Glucotropaeolin zu entwickeln. Dieses Medikament sollte im Gegensatz zum Vorgänger Nephroselect® M ein Kapuzinerkresse-Monopräparat sein, da für die Zulassung von Monopräparaten aus offizinellen Heilpflanzen ein einfacheres und kostengünstigeres Zulassungsverfahren erforderlich ist als bei Kombinationspräparaten. Um eine stabile Wirkung über große Zeiträume garantieren zu können, sollte das Präparat intaktes Glucotropaeolin in getrocknetem Blattmaterial anstelle des instabilen Benzylsenföls im Presssaft enthalten. Als drittes Ziel für die Entwicklung dieses neuartigen Präparates wurde angestrebt, möglichst hohe Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge zu erzielen, um die Einnahme für die Patienten möglichst komfortabel zu gestalten, das heißt die Anzahl und Größe der für eine Tagesdosis notwendigen Tabletten sollte möglichst gering sein. Aus diesen Überlegungen heraus wurde in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig, dem Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde an der FAL, Braunschweig und den Firmen DRELUSO Pharmazeutika (Hessisch-Oldendorf) und Institut für Pflanzenkultur (Schnega) das „*Tropaeolum*-Projekt“ ins Leben berufen.

Um in naher Zukunft eine möglichst weitreichende Verbesserung in der Qualität der pharmazeutischen Nutzung der Kapuzinerkresse sicherzustellen, mussten eine Reihe ganz unterschiedlicher Aspekte bearbeitet werden. Die Teilziele ergeben sich aus den speziellen äußeren Rahmenbedingungen für die landwirtschaftliche Nutzung der Kapuzinerkresse und resultieren aus den besonderen Anforderungen, die im Umgang mit Pflanzenmaterialien,

deren Inhaltsstoffe postmortalen Hydrolysen unterliegenden, zu beachten sind. Im Wesentlichen umfasst die angestrebte Entwicklungsarbeit des gesamten „*Tropaeolum*-Projektes“ die folgenden Punkte:

- Selektion von Kapuzinerkresse-Sorten mit besonders hoher Eignung für die pharmazeutische Nutzung

Da die Kapuzinerkresse bis *dato* nur in Hinblick auf ihre Verwendung als Zierpflanze züchterisch bearbeitet wurde, bestand hoher Bedarf für die Zucht einer „Medizinal-Kapuzinerkresse“, die sich durch eine besondere Eignung für die pharmazeutische Nutzung auszeichnen sollte. Die Auswahlkriterien für die zu erfolgende Selektion waren neben dem möglichst hohen Glucosinolat-Gehalt in der Trockendroge vor allem eine möglichst niedrige Myrosinase-Aktivität im Blattmaterial, um die Verluste während der Ernte und Trocknung möglichst gering zu halten. Außerdem sollten die entsprechenden Pflanzen einen kompakten Wuchs aufweisen, um die Ernte zu erleichtern, und möglichst viel Biomasse produzieren. Ferner ist auch die Eignung für die *in vitro*-Kulturtechnik zur Stammerhaltung und spätere Massenproduktion der selektierten Varietäten von hoher Wichtigkeit.

- Stammerhaltung und Massenvermehrung der selektierten „Medizinal-Kapuzinerkresse“ mit Hilfe der in vitro-Kulturtechnik

Da die Neuzüchtung von Pflanzensorten über Zuchtwahl und Kreuzung, mit dem Ziel sortenreines Samenmaterial zu erzeugen, sehr lange Zeiträume in Anspruch nimmt, soll zur Stammerhaltung und Massenvermehrung der selektierten Einzelpflanzen die *in vitro*-Kulturtechnik genutzt werden. Mit Hilfe der Vielfachsprossbildung soll es ermöglicht werden, die sortenspezifischen Eigenschaften über lange Zeiträume zu bewahren. Zur gezielten Massenvermehrung sollte ein Temporary Immersion System (TIS) eingesetzt werden.

- Steigerung der Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge durch die Optimierung des Anbaus, der Ernte und Trocknung

Ein wesentlicher Faktor zur Qualitätssteigerung des neuen Kapuzinerkresse-Medikamentes besteht neben der Sortenzucht auch darin, die Anbaubedingungen hinsichtlich der in der Trockendroge erzielbaren Glucosinolat-Gehalte zu optimieren, hierzu gehören zum Einen die Wahl der Pflanzabstände und die Zusammensetzung der Düngergaben und zum Anderen die Optimierung der Ernte- und Trocknungsmethoden. Hierzu sollen Methoden und Verfahren entwickelt werden, die gewährleisten, dass der Verlust an Glucosinolaten aufgrund von postmortalen Hydrolysen während der Ernte und Trocknung möglichst gering gehalten werden kann.

- Erstellung des Medikamentes

Der letzte Schritt der Entwicklungsarbeit beinhaltet die Herstellung des Präparates, wozu auch pharmazietechnische Fragestellungen gehören. In diesem Zusammenhang muss auch erarbeitet werden in welcher Darreichungsform, z. B. magensaftresistente Kapseln oder Tabletten, das Präparat produziert werden soll, um die Freisetzung der Senföle nicht bereits

im Magen sondern erst verzögert im Duodenum zu erreichen, um so Irritationen der empfindlichen Magenwand vorzubeugen. Für den Fall, dass die durch die angestrebten Optimierungen erzielten Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge nicht ausreichend hoch sein sollten, so dass die Anzahl der einzunehmenden Tabletten pro Tagesdosis nicht praktikabel ist, bzw. sie nicht auf ein erträgliches Maß reduziert werden kann, müssen alternativ geeignete Trockenextrakte erstellt werden, mit denen die gewünschte Glucosinolat-Konzentration im Präparat erreicht werden kann.

Aus diesen Zielsetzungen ergibt sich eine Vielzahl wissenschaftlicher Fragestellungen, die interdisziplinäre Forschungsansätze erfordern. Im Zuge des Gesamt-Projekts wurden neben dieser Doktorarbeit noch zwei weitere erstellt. Im ersten Teil der hier vorliegenden Dissertation werden vorrangig die erfolgten Arbeiten zur Selektion und Erhaltungszüchtung der „Medizinalkapuzinerkresse“ dargestellt und anschließend diskutiert, wohingegen im zweiten Teil ausschließlich grundlagenwissenschaftliche Aspekte zum Fernstreckentransport des Glucotropaeolins behandelt werden.

1.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte

Über die wissenschaftlichen Aspekte der Kapuzinerkresse als Heilpflanze hinaus ergeben sich aus der dargestellten Thematik viele interessante pflanzenphysiologisch-biochemische Fragestellungen. Dabei kommt dem Glucosinolat-Myrosinase-System eine besondere Bedeutung zu. Im Zentrum stehen Fragen zur Lokalisierung von Glucosinolaten, Myrosinase und Ascorbinsäure innerhalb der pflanzlichen Gewebe, so dass die Glucosinolate nicht fälschlicherweise hydrolysiert werden.

Matile veröffentlichte 1980 mit der „Senfölbombe“ ein grundlegendes Modell zur Lösung dieser pflanzenphysiologischen Problemstellungen (Matile, 1980).

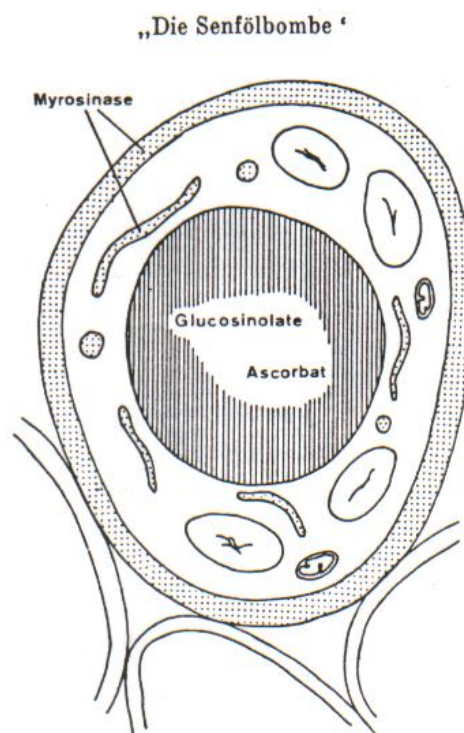


Abbildung 3: Modell zur subzellulären Verteilung von Glucosinolaten, L-Ascorbinsäure (Effektor der Myrosinase) und Myrosinase in Parenchymzellen der Meerrettichwurzel. (Matile, 1980)

Nach diesem Modell liegt in der Meerrettichwurzel (*Armoracia rusticana*) eine intrazelluläre Kompartimentierung vor. Die Glucosinolate und das Ascorbat werden in der Zentralvakuole akkumuliert, und die Myrosinase ist sowohl in membranumschlossenen Vesikeln im Cytoplasma als auch apoplasmatisch im Zellwandraum lokalisiert. Im Laufe der letzten drei Jahrzehnte wurde der Wissensstand hinsichtlich der Lokalisierung des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durch verbesserte Analysenmethoden, aber auch durch zusätzliche Untersuchungen an anderen Pflanzenspezies, beständig erweitert. Doch auch heute noch besitzt das Grundschema der Kompartimentierung für alle glucosinolathaltigen Pflanzen eine

universelle Gültigkeit. In den letzten Jahren wurde vor allem an Raps (*Brassica napus*), Senf (*Sinapis alba*, *Brassica nigra*), der Modellpflanze der Pflanzengenetik *Arabidopsis thaliana* und anderen wirtschaftlich interessanten Brassicaceen geforscht. Für die Kapuzinerkresse sind zurzeit so gut wie keine Kenntnisse zur Lokalisierung der Einzelkomponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems verfügbar.

Für *Tropaeolum majus* wird angenommen, dass das Glucotropaeolin in den Blättern synthetisiert wird und von dort aus im Verlauf der pflanzlichen Entwicklung zu den Blüten und reifenden Samen verlagert wird, da in diesen Organen selbst die entsprechenden synthetischen Enzyme nicht nachweisbar sind (Lykkesfeldt und Möller, 1993). Sollte in *Tropaeolum*, ähnlich wie beim Meerrettich, ein Großteil der Myrosinase im Apoplasten lokalisiert sein, dann ergeben sich für den Langstreckentransport des Glucotropaeolins ganz besondere pflanzenphysiologische Problemstellungen. Denn für die Verlagerung des Glucotropaeolins im Phloem wäre nach den aktuellen Modellen zum Langstreckentransport in Pflanzen zu erwarten, dass das Glucotropaeolin vor der aktiven Aufnahme in die Siebzellen zunächst noch den Apoplasten passieren müsste (apoplastische Phloembeladung). Entsprechend würde auch bei der Phloembeladung fälschlicherweise Glucotropaeolin degradiert werden. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, dass im Apoplasten ebenfalls Ascorbinsäure zugegen ist, die eine Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress z.B. durch Ozon spielt (Polle und Rennenberg, 1993). Einen Überblick über die generellen Problematiken des Phloemtransports bietet eine Publikation von van Bel aus dem Jahr 2003.

Eine mögliche Lösung dieses Problems könnte sich aber vielleicht von den cyanogenen Glucosiden und deren hydrolytischen Enzymen, den β -Glucosidasen, herleiten lassen:

Im Falle des Kautschukbaums *Hevea brasiliensis* wird das cyanogene Glucosid Linamarin zur Mobilisierung glucosyliert und als Linustatin über den Apoplasten transportiert. Im Gegensatz zum Linamarin wird das diglucosidische Linustatin von den ebenfalls apoplastisch vorliegenden β -Glucosidasen nicht gespalten. So ist gewährleistet, dass das Diglucosid den Apoplasten passieren und ins Phloem eingeschleust werden kann. Das Linustatin wird im Phloem transportiert und kann in den Orten des Verbrauchs (sinks) mit einer sequentiellen Diglucosidase wieder zum Linamarin deglucolysiert oder aber mit einer simultanen Diglucosidase direkt zum Cyanohydrin degradiert werden (Selmar, 1993).

Ausgehend von diesen Überlegungen zu Kompartimentierung und Transport werden im zweiten Teil dieser Dissertation generelle pflanzenphysiologische Fragen zur Verlagerung der Glucosinolate in der Kapuzinerkresse bearbeitet und diskutiert.

2 Das Glucosinolat-Myrosinase-System - ein Literaturüberblick

Dieses Kapitel soll einen kurzen Überblick über den aktuellen Stand der wissenschaftlichen Arbeiten zum Glucosinolat-Myrosinase-System geben. Im ersten Teil dieses Literaturüberblicks werden zunächst die biochemisch-pflanzenphysiologischen Grundlagen aufgezeigt, bevor dann mögliche ökologische Funktionen diskutiert werden und auf weiter reichende Bedeutungen der Glucosinolate in Bezug auf die Nutzung durch den Menschen eingegangen wird. Im letzten Teil dieses Kapitels werden der Transport der Glucosinolate, die Evolution der Myrosinasen und Glucosinolate sowie Aspekte der pharmazeutischen Nutzung der Kapuzinerkresse vertiefend behandelt.

2.1. Glucosinolate - eine besondere Gruppe pflanzlicher Naturstoffe

Bei den Glucosinolaten handelt es sich um typische präformierte Abwehrstoffe. Sie repräsentieren inaktive Vorstufen der Senföle, das heißt im Zuge von Gewebsverletzungen werden aus ihnen rasch die biologisch aktiven Senföle freigesetzt. Die Glucosinolate und die daraus freigesetzten Senföle verleihen den sessilen Pflanzen ein hohes Maß an Flexibilität in der Reaktion auf Angriffe potentieller Schadorganismen.

2.1.1 Chemische Struktur

Bereits im Jahr 1831 gelang es Robiquet und Buotron das Sinalbin (4-Hydroxybenzylglucosinolat) aus Samen des Weißen Senfs (*Sinapis alba*) zu isolieren, und etwa ein Jahrzehnt später wurde 1840 das Sinigrin (2-Propenylglucosinolat) aus Schwarzem Senf (*Brassica nigra*) isoliert. (Challenger, 1959). 1897 stellte Gadamer erstmals eine allgemeine Strukturformel für diese Senfölglycoside vor, die jedoch noch nicht ganz korrekt war. Nach ihr sind die variablen Seitenketten an das N-Atom gebunden und nicht an das zentrale C-Atom. Die korrekte, allen Glucosinolaten zugrunde liegende Struktur konnte erst im Jahr 1957 durch Ettlinger und Lundeen zweifelsfrei belegt werden.

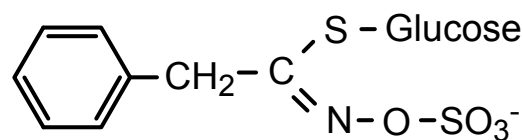


Abbildung 4: Chemische Grundstruktur der Glucosinolate am Beispiel des Glucotropaeolins (Benzylglucosinolat)

Die variable Seitenkette des Glucosinolats Glucotropaeolin ist eine Benzylgruppe.

Glucosinolate bestehen aus einem (Z)-N-Hydroximiniosulfatester, an den eine β -D-Glucopyranose über ein Schwefelatom und eine variable Seitenkette R gebunden sind (Abbildung 4). Der Thioglucoserest und die Sulfatgruppe bewirken den durchweg hydro-

philen Charakter der Glucosinolate. In Lösungen reagieren die Glucosinolate aufgrund des niedrigen pK_a -Wertes der Sulfatgruppe leicht sauer und liegen dissoziiert als Anionen vor (Olsen und Sörensen, 1981; McGregor et al., 1983). Die variablen Seitenketten sind für die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Glucosinolate verantwortlich und dienen auch der Namensgebung:

Die entsprechende chemische Struktur dient als Präfix an die als Endung -glucosinolat angehängt wird. Demnach heißt z. B. das Glucotropaeolin entsprechend der korrekten semisystematischen Bezeichnung Benzylglucosinolat. Meistens werden allerdings die Trivialnamen der Glucosinolate verwendet, die sich im Allgemeinen von der Pflanze ableiten, aus denen sie erstmals isoliert wurden, z.B. Sinigrin (*Brassica nigra*), Sinalbin (*Sinapis alba*) oder Glucotropaeolin (*Tropaeolum majus*), siehe Tabelle 1.

<p>Alanin:</p> $\text{CH}_3-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{S - Glucose} \\ \searrow \text{N - O - SO}_3^- \end{array}$ <p>Methylglucosinolat (Glucocapparin)</p>	<p>Aliphatische Glucosinolate</p> <p>Isoleucin:</p> $\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{S - Glucose} \\ \searrow \text{N - O - SO}_3^- \end{array}$ <p>Allylglucosinolat (Sinigrin)</p>
<p>Aromatische Glucosinolate</p> $\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{S - Glucose} \\ \searrow \text{N - O - SO}_3^- \end{array}$ <p>Benzylglucosinolat (Glucotropaeolin)</p>	<p>$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{S - Glucose} \\ \searrow \text{N - O - SO}_3^- \end{array}$</p> <p>p-Hydroxybenzylglucosinolat (Sinalbin)</p>
<p>Indolglucosinolate</p> $\text{Indol-3-yl}-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{S - Glucose} \\ \searrow \text{N - O - SO}_3^- \end{array}$ <p>3-Indolylmethylglucosinolat (Glucobrassicin)</p>	

Tabelle 1: Einteilung der Glucosinolate entsprechend der verwendeten Aminosäuren

Neben den semisystematischen Namen sind in den Klammern auch die jeweiligen Trivialnamen aufgeführt. Die aliphatischen Glucosinolate stammen von den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Methionin oder Valin ab, die aromatischen Glucosinolate von Phenylalanin oder Tyrosin und die Indolglucosinolate von Tryptophan.

Bis heute sind mehr als 120 unterschiedliche Glucosinolate beschrieben worden. Dennoch lassen sich die zahlreichen Seitenketten auf lediglich acht Aminosäuren zurückführen, die als Basis in die Glucosinolat-Biosynthese eingehen (Fahey et al., 2001). Die offensichtliche,

große Vielfalt der Glucosinolate kommt durch die zahlreichen Modifikationen zustande, die entweder schon vor der Biosynthese an den eingehenden Aminosäuren vollzogen werden, oder aber sekundär an den bereits synthetisierten Glucosinolat-Grundgerüsten stattfinden. Näheres zu den strukturellen Veränderungen der Glucosinolate durch primäre und sekundäre Modifikationen wird in Kapitel 2.1.3 dargestellt.

Die zur Biosynthese genutzten Aminosäuren werden auch zur Klassifizierung der Glucosinolate herangezogen (ebenfalls Tabelle 1). Die aliphatischen Glucosinolate leiten sich von den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Methionin oder Valin ab. Aus Phenylalanin und Tyrosin werden die aromatischen Glucosinolate gebildet. Das Glucotropaeolin in der Kapuzinerkresse hat das Phenylalanin zum Vorläufer. Wohingegen die Indolglucosinolate vom Tryptophan abstammen.

2.1.2 Vorkommen

Zurzeit sind 16 Pflanzenfamilien bekannt in denen Glucosinolate vorkommen. Hiervon wurden nach der Klassifizierung von Dahlgren 15 in der Ordnung Capparales zusammengefasst (Dahlgren, 1977; Dahlgren et al., 1981; Rodman et al., 1996).

Zur Ordnung Capparales gehört auch die Familie der Brassicaceae, die mit ihren 338 Gattungen und 3710 Arten viele für die menschliche Ernährung wichtige Kulturpflanzen beinhaltet. Hierzu gehören die verschiedenen Kohlzüchtungen, wie Weißkohl, Grünkohl, Rotkohl, Brokkoli, Kohlrabi usw., die allesamt der Art *Brassica oleracea* angehören, aber auch das Radieschen (*Raphanus sativus*), der Raps (*Brassica napus*), die verschiedenen Senfarten (Schwarzer Senf: *Brassica nigra*, Brauner Senf: *Brassica juncea*, Weißer Senf: *Sinapis alba*), der Meerrettich (*Armoracia rusticana*), die Kresse (*Lepidium sativum*) und auch die Modellpflanze der modernen molekularen Pflanzenbiologie *Arabidopsis thaliana*. Speziell der Umstand, dass *Arabidopsis* zu den glucosinolathaltigen Pflanzen gehört, hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten äußerst vorteilhaft auf den Wissensstand um die molekularen Zusammenhänge der Glucosinolat-Synthese und deren Regulation ausgewirkt.

Weitere für die menschliche Nutzung interessante Vertreter der Capparales finden sich unter anderem in den Familien der Capparaceae (Kapernstrauch-*Capparis spinosa*), Caricaceae (Papaya - *Carica papaya*) und den Tropaeolaceae, mit der Großen Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) und der Knolligen Kapuzinerkresse (*Tropaeolum tuberosum*). Die Knollige Kapuzinerkresse wird in ihrer Heimat den Zentralanden als Gemüsepflanze angebaut, und spielt besonders in der Ernährung der Bevölkerung karger Bergregionen eine wichtige Rolle.

Außer in der Ordnung der Capparales kommen Glucosinolate im Pflanzenreich nur noch in der Familie der Wolfsmilchgewächse (Euphorbiaceae) in der Gattung *Drypetes* vor. Kladistische Vergleiche der Nucleotidsequenzen des Gens der großen Untereinheit der Rubisco (*rbcL*) und der 18S ribosomalen RNA-Gene zeigten auf, dass die Gattung *Drypetes*

nicht näher mit der Ordnung Capparales verwandt ist (Rodman et al., 1993, 1998). Diese Ergebnisse und Vergleiche der Biosynthesewege der Glucosinolate und der cyanogenen Glucoside, sowie strukturelle Vergleiche der Myrosinasen und β -O-Glucosidasen, legen nahe, dass das Glucosinolat-Myrosinase-System in der Evolution der Pflanzen mehrfach entstanden sein muss.

2.1.3. Biosynthese

Erste wichtige Arbeiten zur Synthese der Glucosinolate in verschiedenen Pflanzenspezies wurden bereits um 1970 veröffentlicht (Underhill et al., 1973). Doch erst in den letzten zwei Jahrzehnten gelang es durch die vollständige Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms, den Biosyntheseweg der Glucosinolate nahezu komplett aufzuklären (Halkier und Gershenzon, 2006). Außerdem gelang es auch, erste Regulatoren dieses Stoffwechselweges zu identifizieren und Glucosinolatprofile zu verändern, was es ermöglicht, die Funktionen von Glucosinolaten gezielter zu untersuchen oder den Nährwert von Lebens- und Futtermitteln zu beeinflussen.

Die Biosynthese der Glucosinolate, die ausschließlich im Cytoplasma realisiert wird, lässt sich im Wesentlichen in drei Schritte untergliedern:

1. Seitenketten-Verlängerung der Aminosäuren
2. Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur
3. Sekundäre Modifikationen

Seitenketten-Verlängerung der Aminosäuren

Zahlreiche aliphatische und aromatische Aminosäuren werden vor der Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur durch Einfügen von Methylengruppen in die Seitenketten verlängert. Erste Experimente zur Seitenketten-Verlängerung der in die Glucosinolat-Biosynthese eingehenden Aminosäuren wurden bereits um 1960 mit radioaktiv markierten Aminosäuren und Acetat durchgeführt (Chisholm und Wetter, 1964; Lee und Serif, 1970). Die Seitenkettenverlängerung verläuft in Zyklen, von denen bis zu elf in Pflanzen nachgewiesen werden konnten (Kjaer und Schuster, 1972a/b).

Bevor die Aminosäuren in den Seitenketten verlängert werden können, erfolgt zunächst eine Transaminierung zur korrespondierenden 2-Oxo-Säure (Abbildung 5). Als zweiter Schritt folgt eine Aldol-Kondensation mit Acetylcoenzym A (AcCoA). Die in dieser Reaktion entstehenden 2-Malat-Derivate isomerisieren zu den entsprechenden 3-Malat-Derivaten. Diese werden unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ oxidiert und unter Decarboxylierung zu einer um eine Methyleneinheit verlängerte 2-Oxo-Säure umgewandelt. Diese 2-Oxo-Säuren können entweder erneut um eine weitere Methyleneinheit verlängert werden oder unter

Transaminierung zu einer um eine Methyleneinheit verlängerte Aminosäure umgewandelt werden, die in die Synthese des Glucosinolat-Grundgerüsts eingehen kann.

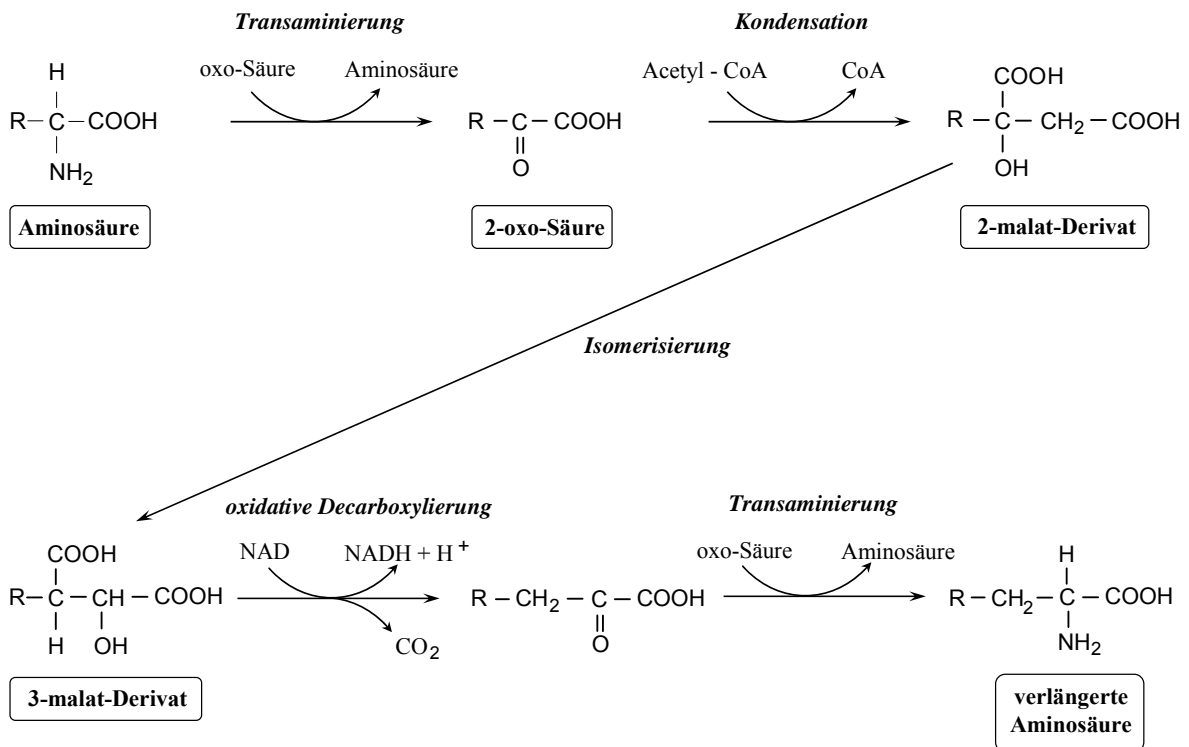


Abbildung 5: Seitenkettenverlängerung der Aminosäuren

Die Aminosäuren werden um jeweils eine Methyleneinheit (CH_2) verlängert und gehen dann entweder in die Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur ein oder können um weitere CH_2 -Einheiten verlängert werden (Selmar, 1999)

Erste Hinweise auf die genetischen Mechanismen zur Regulierung der Aminosäure-Seitenketten-Verlängerung stammen von Magrath et al. (1994), die in *Arabidopsis* und *Brassica napus* einen Genlocus identifizierten, der die Kettenlänge aus Methionin synthetisierter Glucosinolate kontrolliert. Inzwischen konnten in *Arabidopsis* drei Gene identifiziert werden, die so genannten MAM-Gene (Methylthioalkylmalatesynthase), deren Proteinprodukte eine wichtige Rolle in der Regulation der Länge der Seitenketten des Methionins spielen. Das Produkt des MAM1-Gens führt nur die Kondensationsreaktionen der ersten beiden Kettenverlängerungen durch (Textor et al., 2004), wohingegen MAM2 ein Protein kodiert, das lediglich eine Kettenverlängerung um eine Methyleneinheit durchführt. Die untersuchten *Arabidopsis*-Ökotypen wiesen entweder MAM1 oder MAM2 auf, aber niemals beide Gene gleichzeitig. MAM3 wiederum kodiert für ein Protein, das mit niedriger Spezifität die sämtlichen bis zu sechs in *Arabidopsis* nachgewiesenen Kettenverlängerungen des Methionins katalysiert (Field et al., 2004; Textor et al., 2004; Textor et al., 2006).

Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur

In die Biosynthese der Glucosinolat-Grundstruktur gehen entweder die Aminosäuren direkt oder ihre in der Seitenkette verlängerten Derivate ein. Im Falle des Glucotropaeolins der Kapuzinerkresse wird Phenylalanin eingespeist (Lykkesfeldt und Möller, 1993). Der komplette Biosyntheseweg ist in Abbildung 6 dargestellt. Seit dem Jahr 2000 konnten bis auf das Gen für die S-Alkylierung sämtliche diesem Stoffwechselweg zugrunde liegenden Gene identifiziert werden (Halkier und Gershenzon, 2006).

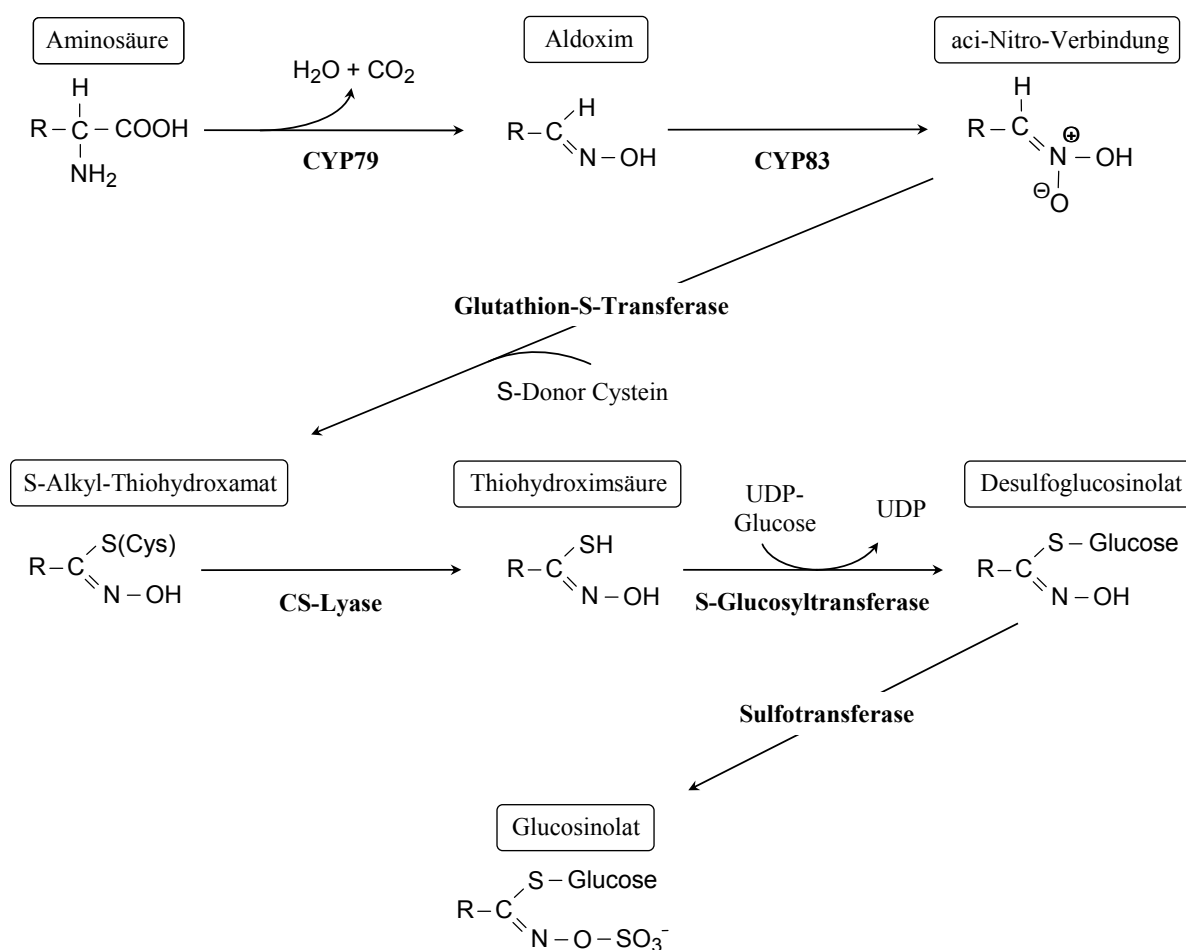


Abbildung 6: Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur

In die Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur gehen Aminosäuren oder in der Seitenkette modifizierte Aminosäuren ein. Als Zwischenprodukte treten unter anderem Aldoxime, Thiohydroximate und Desulfoglucosinolate auf (nach Selmar, 1999; Halkier und Gershenzon, 2006).

Die in die Biosynthese der Glucosinolate eingehenden Aminosäuren werden in drei Hauptschritten zu den Glucosinolaten umgewandelt. Zuerst werden sie zu Aldoximen umgewandelt, dann erfolgt Bildung der Thiohydroximate und im letzten Schritt erfolgt die Glucosylierung und Sulfatisierung der Thiohydroximate zum Glucosinolat.

Umwandlung der Aminosäuren zu Aldoximen

Im ersten Abschnitt der Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur werden die Aminosäuren zu Aldoximen umgewandelt. Diese Reaktion scheint nach den bisherigen Erkenntnissen von drei unabhängig voneinander entwickelten Enzymsystemen katalysiert zu werden.

In *Arabidopsis thaliana* sind sieben sich in der Substratspezifität unterscheidende Cytochrom P450 Monooxygenasen der Cyp79-Familie für diese Reaktion identifiziert worden (Halkier et al., 2002). Auch in der Kapuzinerkresse wird die Bildung des Aldoxims aus Phenylalanin von Cytochrom P450 Monooxygenasen durchgeführt (Du und Halkier, 1996).

Es gibt aber auch Hinweise auf alternative Synthesewege zur Bildung von Oximen aus Vorläufer-Aminosäuren. In einigen Pflanzen der Ordnung Brassica wurde gezeigt, dass die Oxime nicht durch Cytochrom P450 vermittelte Oxidation entstehen, sondern dass diese Reaktion von flavinhaltigen Monooxygenasen katalysiert wird (Bennett et al., 1995; Bennet, 1996; Oldfield et al., 1999). In Chinakohl (*Brassica campestris*), werden die Indol-Aldoxime mittels Membran gebundener Peroxidasen gebildet (Ludwig-Müller et al., 1990).

Offensichtlich sind neben dem vorherrschenden Syntheseweg über die Cytochrom P450 Monooxygenasen noch zwei weitere Nebenwege zur Synthese von Aldoximen im Glucosinolatstoffwechsel der Pflanzen realisiert.

Umwandlung der Aldoxime zu Thiohydroximaten

Im zweiten Abschnitt der Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur werden die Oxime durch Enzyme der CYP83-Familie oxidiert. Es entstehen äußerst reaktive Intermediate, die aufgrund ihrer Instabilität jedoch bislang noch nicht isoliert werden konnten. Es wird angenommen, dass es sich bei diesen Zwischenprodukten um aci-nitro-Verbindungen oder Nitriloxide handelt (Hansen et al., 2001; Bak et al., 2001). Im Anschluss folgt eine Übertragung von Schwefel durch den S-Donor Cystein (Wetter und Chisholm, 1968). Das Enzym, das diese Reaktion vermittelt, konnte bislang jedoch noch nicht identifiziert werden. Es wird vermutet, dass ein der Glutathion-S-Transferase ähnliches Protein diese Aufgabe übernommen hat (Wetter und Chisholm, 1968).

Der nächste Schritt ist die Spaltung der S-Alkyl-Thiohydroximate zu Thiohydroximaten. Kürzlich gelang es, in *Arabidopsis thaliana* eine C-S-Lyase zu identifizieren, die in der Lage ist, die Spaltung der S-Alkyl-Thiohydroximate zu Thiohydroximaten zu katalysieren (Mikkelsen et al., 2004).

Umwandlung der Thiohydroximate zu Glucosinolaten

Im letzten Abschnitt der Synthese der Glucosinolat-Grundstruktur wird die gebildete Thiohydroximsäure durch Glucosylierung stabilisiert. Diese Reaktion wird durch eine S-Glucosyltransferase katalysiert. Dabei wird die Glucose mittels UDP-Glucose auf die

Thiohydroximate übertragen (Grubb et al., 2004). Die entstehenden Desulfoglucosinolate werden im letzten Schritt der Synthese des Glucosinolat-Grundgerüsts mit einer Sulfotransferase zu den Glucosinolaten umgewandelt, wie von Piotrowski und Mitarbeitern 2004 gezeigt werden konnte. Die Sulfatgruppe wird indes vom Sulfatdonor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) beigesteuert.

Sekundäre Modifikationen

An den variablen Seitenketten der synthetisierten Glucosinolat-Grundstrukturen können eine Reihe an sekundären Modifikationen durchgeführt werden, die sowohl einen starken Einfluss auf die Hydrolyse der Glucosinolate als auch auf die Eigenschaften der resultierenden Hydrolyseprodukte haben. Im Wesentlichen handelt es sich bei den Seitenketten-Modifikationen um Oxidationsreaktionen von Methylthiogruppen zu Methylsulfinyl- und Methylsulfonylgruppen. Die resultierenden Methylsulfinylalkyl-Glucosinolate unterliegen oftmals weiteren oxidativen Spaltungen zu Alkenyl- oder Hydroxyalkylglucosinolaten. Des Weiteren wurden sekundär auftretende Veresterungen von Hydroxylgruppen mit Benzoesäure beschrieben (Graser et al., 2004).

Sowohl über die physiologischen als auch über die genetischen Grundlagen dieser zahlreichen Modifikationen ist allerdings bislang sehr wenig bekannt. In *Arabidopsis* wurde ein Gencluster von drei Genen identifiziert, der die schrittweise Oxidation der Seitenketten kontrolliert (Hall et al., 2001; Kliebenstein et al., 2001). Bisher gelang es, zwei dieser drei Gene genauer zu charakterisieren (Kliebenstein et al., 2001). Bei den Genprodukten handelt es sich um 2-Oxosäure abhängige Dioxygenasen (Prescott und John, 1996). Im Gegensatz dazu katalysiert in *Brassica napus* ein den Cytochrom P450 Monooxygenasen ähnliches Enzym die Hydroxylierung des Butenylglucosinolates zum 2-Hydroxy-3-Butenylglucosinolat (Rossiter et al., 1990).

2.1.4. Regulation des Glucosinolat-Stoffwechsels

Die Glucosinolat-Gehalte unterliegen je nach untersuchter Art, Organ und Entwicklungsstatus der untersuchten Pflanzen einer äußerst großen Variabilität. Dabei wirkt eine ganze Reihe von Faktoren regulierend auf den Glucosinolat-Stoffwechsel. Ganz allgemein lässt sich die Aussage treffen, dass die Höhe der Glucosinolat-Gehalte und Verteilungsmuster sowohl genetisch (endogen) als auch von äußeren Faktoren (exogen) determiniert werden:

Endogene Faktoren

Die Glucosinolat-Gehalte und -Muster innerhalb einer Pflanze sind oftmals entwicklungs- und organspezifischen Regulationen unterlegen. Die höchsten Glucosinolat-Gehalte treten in den generativen Organen wie den Samen auf (Mithen et al., 2000; Thies 1988), gefolgt von jungen Blättern (Bennett et al., 1995; Bergmann, 1970). In diesem Zusammenhang ist die

Arbeit von Lykkesfeldt und Möller (1993) zu beachten, die eine Verlagerung des Glucotropaeolins vom Ort der Synthese (Blätter) zu den Samen beschreibt, in denen sich die höchsten Glucosinolat-Gehalte in der Kapuzinerkresse nachweisen lassen.

Auch in verschiedenen Brassicaceae, die im Gegensatz zu *Tropaeolum majus* ein komplexes Gemisch an Glucosinolaten enthalten, wurden starke vom Entwicklungsstand abhängige Schwankungen des Glucosinolat-Gehaltes und -Musters beschrieben (z. B. *Brassica napus*-Sämlinge (Porter et al., 1991)).

In *Arabidopsis* konnten erhebliche Fortschritte in der Entschlüsselung der genetischen Grundlagen der Regulation der Biosynthese der Glucosinolate gemacht werden. In dieser Spezies scheinen die aliphatischen Glucosinolate stark entwicklungsspezifisch reguliert zu werden (Kliebenstein et al., 2002; Mikkelsen et al. 2003). Ein entsprechender Transkriptionsfaktor konnte bereits ausfindig gemacht werden. Einen sehr guten Überblick der Biosynthese der Glucosinolate vermittelt ein Review von Halkier aus dem Jahr 2006.

Umwelt-Faktoren:

Abiotische Faktoren wie Licht und Schwefelversorgung

Eine weniger bekannte Funktion des Glucosinolat-Myrosinase-Systems dürfte in seiner Einbindung in phototrope Reaktionen liegen (Hasegawa et al., 2000). Im Hypokotyl des Rettichs (*Raphanus sativus*) wird bei Beleuchtung mit blauem Licht die Myrosinase induziert. Dadurch wird das im Pflanzenmaterial enthaltene 4-Methylthio-3-Butenylglucosinolat gespalten. Das bei dieser Hydrolyse entstehende Isothiocyanat reagiert weiter zu den so genannten Raphanusaninen. Diese Substanzen sind Wachstumsinhibitoren. Da sie auf der Seite des Hypokotyls, auf der das Licht auftrifft, gebildet werden, resultiert aus der lokalen Wachstumshemmung eine phototrope Krümmung des Sprosses. Wie diese Wachstumsregulation bzw. die Kompartimentierung auf zellulärer Ebene verwirklicht ist, ist bislang nicht geklärt. Leider wurden von den Autoren Untersuchungen zur Lokalisierung von Glucosinolaten und Myrosinasen innerhalb der Gewebe nicht in die Analysen mit einbezogen.

Die Versorgung der Pflanzen mit dem Element Schwefel hat einen ganz beachtlichen Einfluss auf die Höhe der Glucosinolat-Gehalte. Mit einer gezielten Schwefeldüngung gelang es Bloem und Mitarbeitern (2001) den Glucotropaeolin-Gehalt in den Blättern von *Tropaeolum majus* von rund 48 $\mu\text{mol/g}$ TG auf über 80 $\mu\text{mol/g}$ TG signifikant zu steigern. Diese Ergebnisse sollten immer dann unbedingt berücksichtigt werden, wenn angestrebt wird, Pflanzen mit möglichst hohen Glucosinolat-Gehalten, z. B. für die pharmazeutische Nutzung, anzubauen.

Ein weiterer Aspekt in Bezug auf die Schwefelversorgung der Pflanzen ergibt sich daraus, dass die Glucosinolate prinzipiell auch als Schwefelspeicher dienen können. Und im Falle starken Schwefelmangels, kann durch die systematische Hydrolyse der Glucosinolate Schwefel remobilisiert werden (Schnug, 1990).

*Umweltfaktoren:
Faktoren der belebten Umwelt*

Ebenfalls einen ganz erheblichen Einfluss auf die Höhe und Zusammensetzung der Glucosinolate haben Herbivoren (Insekten und Mollusken) und Pathogene (Bakterien und Pilze), die in ökologischer Wechselwirkung mit den glucosinolathaltigen Pflanzen stehen. Am deutlichsten sind in diesem Zusammenhang die Veränderungen der Glucosinolate, die im Zuge pflanzlicher Abwehrreaktionen auf Verletzungen, Insektenfraß und Pathogenbefall eintreten. Zum einen sinken die Glucosinolat-Gehalte in den direkt vom Befall betroffenen Geweben als Folge der Senfölbildung in den postmortalen Abwehrreaktionen, zum anderen werden aber auch die *de novo* Synthesen von Glucosinolaten induziert, um die potentielle Verteidigungsfähigkeit in den anderen Gewebsbereichen der Pflanzen zu erhöhen.

So wird in Rapspflanzen, die vom Rapserrdfloh (*Psylliodes chrysocephala*) befallen werden, spezifisch die Biosynthese von Indolglucosinolaten induziert, wohingegen die Synthese aliphatischer Glucosinolate gleichzeitig abnimmt (Koritsas et al., 1991). Ähnliche Effekte wurden in *Brassica napus* und anderen Brassicaceen auch als Folge von Verletzungen (Bartlett et al., 1999), Pathogenbefall (Birch et al., 1990), Pilzbefall (Li et al., 1999) und Schneckenfraß (Birch et al. 1990) dokumentiert.

Entsprechend ihrer Funktion in der pflanzlichen Abwehr lässt sich die Biosynthese der Glucosinolate auch von systemischen Signalstoffen wie Salicylsäure und Jasmonsäure induzieren. Innerhalb der Gattung *Brassica* wurde wiederholt festgestellt, dass durch Applikation von Salicylsäurederivaten aromatische Glucosinolate akkumuliert wurden, wohingegen die Gabe verschiedener Jasmonsäurederivate vornehmlich zu einer Erhöhung der Indolglucosinolat-Gehalte führte (Doughty et al., 1995; Ludwig-Müller et al., 1997; Cole, 1996; Bennett et al. 1997). Im Gegensatz hierzu wiesen Du und Halkier (1996) in mit Jasmonsäure behandelten Sämlingen der Kapuzinerkresse die *de novo* Biosynthese des aromatischen Glucotropaeolins nach.

In *hairy roots*-Kulturen von *Tropaeolum majus* induzierte sowohl die Gabe von Salicylsäure als auch von Jasmonsäure die Glucotropaeolin-Produktion, jedoch erwies sich die Salicylsäure als der stärkere Induktor (Wielanek und Urbanek, 2006).

Expressionsstudien haben gezeigt, dass das Cytochrom P450 CYP79B3 zur Synthese von Indol-Aldoximen aus Tryptophan durch Methyljasmonat induziert wird, wohingegen die Induktion von CYP79B2 mit der Produktion des Phytoalexins Camalexin gekoppelt zu sein scheint (Brader et al., 2001; Mikkelsen et al., 2003; Glawischnig et al., 2004).

2.2 Thioglucohydrolasen - Myrosinasen

Die Myrosinasen bilden zusammen mit den Glucosinolaten eine präformierte Abwehr aus. Sie katalysieren nach einer Gewebsverletzung die Hydrolyse der Glucosinolate und leiten somit die Bildung der bioaktiven Senföle ein.

Aus entwicklungsphysiologischer Sicht lassen sich die Myrosinasen von den ubiquitär im Pflanzenreich verbreiteten β -Glucosidasen ableiten und sind diesen in zahlreichen Aspekten sehr ähnlich.

2.2.1 Klassifizierung

Als Myrosinasen oder Thioglucohydrolasen (EC 3.2.147) werden Enzyme bezeichnet, die die Hydrolyse von Thioglucosiden in Gegenwart von Wasser zu Glucose und Thiolen (Thiohydroximat-O-Sulfonate und Thiohydroxamat-O-Sulfonate) katalysieren. Sämtliche Folgereaktionen, die zur Bildung der zahlreichen Senföle führen, stehen nicht in direktem Zusammenhang mit den Myrosinasen.

In der Nomenklatur der Enzyme bilden die Myrosinasen eine gemeinsame Superfamilie mit den β -O-Glucosidasen (EC 3.2.1) und werden im Weiteren den Glycosidasen (EC 3.2) und Hydrolasen (EC 3) zugeordnet (Int. Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2007).

In ihrer dreidimensionalen Struktur und in ihren physikochemischen Eigenschaften sind sich die Myrosinasen und die im Pflanzenreich ubiquitär verbreiteten β -O-Glucosidasen sehr ähnlich. Ebenso wie die β -O-Glucosidasen sind die Myrosinasen Homo- oder Oligomere, beide Enzyme sind stark glycosyliert und besitzen zumeist eine relativ geringe Substratspezifität. Die relevanten Unterschiede zwischen β -S und β -O-Glucosidasen liegen darin, dass die Myrosinasen ausschließlich S-Glucoside als Substrate akzeptieren und fast immer durch Ascorbinsäure aktivierbar sind (Rask et al., 2000).

2.2.2 Vorkommen

Die Erstbeschreibung einer Myrosinase erfolgte von Bussy (1840), der die Glucosinolate in *Brassica nigra* untersuchte und dabei eine Substanz mit albuminartigem Charakter fand, die das Sinigrin zu spalten vermochte.

Das Vorkommen der Myrosinasen beschränkt sich nicht nur auf die glucosinolathaltigen Pflanzen der Ordnung Capparales. Enzyme mit Myrosinase-Aktivität wurden auch in den Pilzen *Aspergillus niger* und *Aspergillus sydowi* (Reese et al., 1958; Ohtsuru und Hata, 1973), sowie in den Bakterien *Enterobacter cloacae* und *Paracolonobacterium aerogenoides* des menschlichen Verdauungstraktes vorgefunden (Tani et al., 1974; Oginsky et al., 1965). Interessanterweise besitzen auch die auf verschiedene Brassicaceae-Arten spezialisierten Blattläuse *Brevicoryne brassicae* und *Lipaphis erisimi* Myrosinasen (MacGibbon und Beuzenberg, 1978). Sie reichern die aus ihren Wirtspflanzen aufgenommenen Glucosinolate

an und können daraus im Falle eines Angriffs durch Fraßfeinde sogar Senföle freisetzen (Bridges et al., 2001). Inwieweit diese Reaktion als eine direkte Abwehrreaktion zu verstehen ist oder zur Warnung der eigenen Artgenossen dient, ist bislang nicht geklärt.

Hinsichtlich der organ- und entwicklungsspezifischen Verteilung von Myrosinase-Aktivitäten wurden die umfassendsten Untersuchungen an *Brassica napus* durchgeführt (Bones, 1990). In Sämlingen zeigte das Hypokotyl die höchste spezifische Myrosinase-Aktivität; sie war etwa zweimal höher als in den Kotyledonen und sogar mehrere Male höher als in den Wurzeln. Im Gegensatz dazu werden in ausgewachsenen Rapspflanzen die höchsten Myrosinase-Aktivitäten in der Wurzelrinde gemessen (Höglund et al., 1991).

Recht ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen an Rettich (*Raphanus sativus*), Kohlrübe (*Brassica campestris*) und Wasabi (*Wasabi japonica*). In diesen Pflanzen wurden auch in den Wurzeln die höchsten Myrosinase-Aktivitäten gemessen, hier vor allen Dingen im Kortex und im Bereich der Leitbündel (Hara et al., 2001).

In Rosenkohl (*Brassica oleracea*) wurden in den äußeren Blättern etwa 4-5mal höhere Myrosinase-Aktivitäten als in den inneren Bereichen der Pflanzen (Blätter, Stängel usw.) festgestellt (Springett und Adams, 1989).

Die aufgeführten Befunde zur gewebsspezifischen Lokalisierung der Myrosinasen werden meist in Hinblick auf eine Einbindung dieser Enzyme in die pflanzliche Abwehr diskutiert.

2.2.3 Physikochemische Eigenschaften

Die Molekulargewichte der bislang untersuchten Myrosinasen lagen alle im Bereich zwischen 120-150 kDa eine Ausnahme stellt die Myrosinase aus Wasabi (*Wasabi japonica*) dar, deren Molekulargewicht bei etwa 580 kDa liegt (Björkman und Janson, 1972; Bones und Slupphaug, 1989; Lönnerdal und Janson, 1973; Ohtsuru und Kawatani, 1979).

Der Grad der Glycosylierung der Myrosinasen ist mit 10-20 % der gesamten Masse ausgesprochen hoch, bei den gebundenen Glycosiden handelt es sich vornehmlich um Acetylglucosamin (Rask et al., 2000).

Die pH-Optima verschiedener aus Brassicaceae isolierter Myrosinasen variieren in einem weiten Bereich zwischen 4,0 und 7,0 und die isoelektrischen Punkte liegen im Bereich zwischen 4,6 und 6,2 (Björkman, 1976; Bones und Rossiter, 1996).

Ein spezielles Charakteristikum der Myrosinasen ist ihre Aktivierbarkeit durch Ascorbinsäure. Bei einer Untersuchung von sieben Brassicaceae-Varietäten wurden Ascorbinsäure-Konzentrationen von 0,7-5 mM ermittelt, die zu einer maximalen Aktivierung der einzelnen, partiell aufgereinigten Myrosinasen führen (Wilkinson et al., 1984). Auch die Ausprägung der Aktivierung der Myrosinasen einzelner Arten ist sehr stark variabel. Einige Myrosinasen, vor allem Isoformen der Myrosinase aus *Sinapis alba*, zeigen eine stete Grundaktivität und sind nicht oder nur leicht um den Faktor 2-3 aktivierbar (Ohtsuru und

Hata, 1972; Björkman und Lönnerdal, 1973). Die meisten Myrosinasen der Brassicaceae hingegen weisen eine geringe Grundaktivität auf und sind um den Faktor 8-12 relativ stark aktivierbar (Björkman und Lönnerdal, 1973). In seltenen Fällen wurde von Myrosinasen berichtet, die in Abwesenheit von Ascorbinsäure nahezu keine Aktivität aufweisen. Für diese Enzyme wirkt die Verfügbarkeit von Ascorbinsäure im Prinzip wie ein Schalter und ist somit eine Grundvoraussetzung für die hydrolytische Aktivität (Kleinwächter und Selmar 2004; Shikita et al., 1999), siehe auch Abbildung 7.

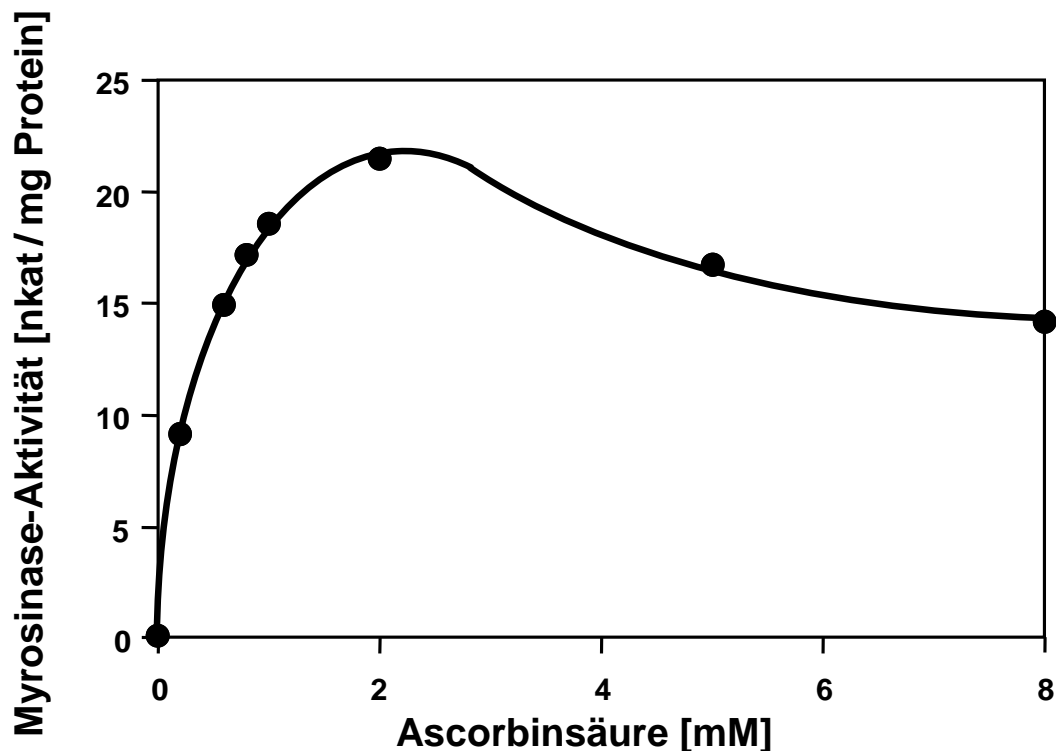


Abbildung 7: Abhängigkeit der Myrosinase-Aktivität von der Ascorbinsäure-Konzentration (*Tropaeolum majus*)

Die Myrosinase aus *Tropaeolum* weist die höchste Aktivität bei einer Ascorbinsäure-Konzentration von 2 mM auf. In Abwesenheit von Ascorbinsäure ist sie nahezu inaktiv. Hingegen bei höheren Ascorbinsäure-Konzentrationen als 2 mM nimmt die Umsatzgeschwindigkeit leicht ab (Kleinwächter und Selmar, 2004).

Shikita et al. charakterisierten 1999 eine Myrosinase aus *Raphanus sativus*, die ein solch besonderes Aktivierungsverhalten aufweist. Aufgrund des beobachteten parallelen Anstiegs von V_{\max} und K_m während der Aktivierung klassifizieren die Autoren dieses Phänomen als unkompetitive Aktivierung, in Anlehnung an die selten zu beobachtende unkompetitive Inhibierung von Enzymen, bei der K_m und V_{\max} im gleichen Verhältnis zueinander abnehmen. Die Autoren deuteten ihre Ergebnisse dahingehend, dass in diesem Fall die Ascorbinsäure an den Enzym-Substrat-Komplex bindet und erst im zweiten Schritt der Hydrolyse der Glucosinolate eingreift.

Allerdings sind die meisten in der Vergangenheit durchgeführten Bestimmungen von Myrosinase-Aktivitäten in Gegenwart von Ascorbinsäure mit unterschiedlich großen Fehlern belastet und müssen daher eher kritisch betrachtet werden. Die Fehlbestimmungen rühren daher, dass die Ascorbinsäure selbst oder Abbauprodukte der instabilen Ascorbinsäure mit den meisten gängigen Bestimmungsmethoden interferieren, was aber in den durchgeführten Aktivierungsstudien so gut wie nie berücksichtigt wurde.

Im Jahr 2004 veröffentlichten Kleinwächter und Selmar eine auf der HPLC basierende Methode mit der es erstmals möglich wurde, Myrosinase-Aktivitäten in Gegenwart von Ascorbinsäure-Konzentrationen von bis zu 10 mM zuverlässig und interferenzfrei zu bestimmen (Kleinwächter und Selmar, 2004). Mit Hilfe dieser Methode gelang es erstmals, eine Myrosinase-Aktivität, die von *Tropaeolum majus*, in Abhängigkeit der Ascorbinsäure-Konzentration zweifelsfrei zu dokumentieren (Abbildung 7).

Die Myrosinase in *Tropaeolum majus* weist ein spezielles Aktivierungsverhalten auf: in Abwesenheit von Ascorbinsäure ist das Enzym nahezu inaktiv, sobald jedoch Ascorbinsäure dem Reaktionsansatz beigegeben wird, resultiert eine drastische Steigerung der hydrolytischen Aktivität. Bei einer Ascorbinsäure-Konzentration von 2 mM wurden die höchsten Myrosinase-Aktivitäten ermittelt. Bei höheren Ascorbinsäure-Konzentrationen von 2-8 mM nimmt die Myrosinase-Aktivität wieder leicht ab.

2.2.4 Myrosinase-Isoformen

In den bislang untersuchten Pflanzen treten immer mehrere Isoformen der Myrosinase nebeneinander auf. Die Gene der einzelnen Myrosinasen werden von Multigen-Familien kodiert. So weisen z.B. *Brassica napus* und *Sinapis alba* rund 20 verschiedene Myrosinase-Isoformen auf (Rask et al., 2000), wohingegen in *Arabidopsis thaliana* lediglich vier verschiedene Isoformen nachgewiesen werden konnten (Xue et al., 1995; Xu et al., 2004).

Die Expression der verschiedenen Myrosinase-Isoformen scheint organ- und gewebespezifisch in Abhängigkeit von der pflanzlichen Entwicklung reguliert zu werden, allerdings konnten deren Funktionen noch nicht geklärt werden (Lenman et al., 1993; Xue et al., 1993; Rask et al., 2000).

2.2.5 Myrosinase-bindende und assoziierte Proteine

In den pflanzlichen Geweben liegen die Myrosinasen in enger Assoziation mit einer Reihe weiterer Proteine vor, die mit gegen Myrosinasen gerichteten Antikörpern copräzipitieren (Lenman et al., 1990). Diese Proteinkomplexe erreichen Molekulargewichte bis 800 kDa und bestehen neben den Myrosinasen aus einer Reihe von Myrosinase-bindenden Proteinen (MBPs) und Myrosinase-assoziierten Proteinen (MyAP) (Taipalensuu et al., 1996).

Ebenso wie die Expression der Myrosinasen, kann die Expression der MBPs und MyAP durch Verwundung und Gabe von Methyljasmonat induziert werden (Geshe und Brandt, 1998; Taipalensuu et al., 1997).

Über die Bedeutung und Funktionen dieser Proteine gibt es bislang noch keine gesicherten Erkenntnisse. Einige Autoren diskutieren stabilisierende Funktionen auf die Myrosinasen und die Einbindung in die Abwehr von Pathogenen und Pilzen. Diese mögliche Bedeutung wird auch den MBPs zugesprochen, da sie oftmals eine den Lektinen ähnliche Struktur und Bindungseigenschaften aufweisen (Taipalensuu et al., 1997; Rask et al., 2000).

2.2.6 Molekulare Struktur der Myrosinasen

Im Jahr 1997 gelang es Burmeister und Mitarbeitern erstmals eine Myrosinase zu kristallisieren und deren molekulare Struktur aufzuklären. Die untersuchte Myrosinase, die aus Samen von *Sinapis alba* isoliert und aufgereinigt wurde, wies eine Kettenlänge von 499 Aminosäuren auf und zeigte auch eine $(\beta/\alpha)_8$ Barrel-Faltung, wie sie für die nah verwandten β -O-Glucosidasen charakteristisch ist. Innerhalb dieser Sekundärstruktur existieren viele ionische Bindungen, Disulfidbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen, die den Myrosinasen ihre hohe Temperatur- und osmotische Stabilität verleihen dürften.

In Lösung liegt die Myrosinase als ein Dimer vor, dass über ein Zn^{2+} -Kation stabilisiert wird. Die gesamte Oberfläche des Myrosinase-Dimers ist von Zuckerresten bedeckt, die diesem Enzym eine sehr gute Wasser-Löslichkeit verleihen. Unter den Zuckerketten wurde an der Oberfläche ein Heptasaccharid entdeckt, dass von seiner Struktur her einem pflanzlichen Lektin sehr ähnelt. Die Funktion der Oberflächen-Glycoside könnte darin bestehen, dass sie zu einer Stabilisierung dieser Myrosinase im trockenen Milieu des Samens beitragen könnten, aus dem sie isoliert wurde (Burmeister et al., 1997).

Zwei weitere funktionale Bereiche konnten im Bereich des aktiven Zentrums des Enzyms identifiziert werden. Eine Tasche mit einer ausgeprägten Häufung lipophiler Aminosäuren, die der Bindung der hydrophoben Seitenketten der Glucosinolate dienen dürfte, sowie ein Bereich mit zwei Arginin-Resten, die so positioniert sind, dass sie die für die Glucosinolate typischen Sulfatgruppen binden können, und somit eine spezifische Substrat-Erkennungsstelle bilden.

2.3 Kompartimentierung und Stoffwechsel

Die Frage der Lokalisierung der Komponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in den pflanzlichen Geweben stellt aus pflanzenphysiologischer Sicht mit Sicherheit eine der interessantesten, wenngleich auch schwierigsten Problemstellungen dar.

Völlig unumstritten handelt es sich bei dem von Lüthy und Mathile (1980) vorgestellten Modell der „Senfölbombe“ um einen Meilenstein in Richtung zur Lösung dieser komplexen Fragestellungen (siehe 1.2). Erstmals wird eine räumliche Trennung von Myrosinasen,

Glucosinolaten und Ascorbinsäure in Form einer intrazellulären Kompartimentierung vorgeschlagen.

Geradewegs im letzten Jahrzehnt scheint sich aber immer deutlicher abzuzeichnen, dass vermutlich unterschiedliche Systeme der Kompartimentierung in verschiedenen Pflanzenspezies verwirklicht wurden, die auch mit den unterschiedlichen Funktionen des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in Zusammenhang stehen könnten.

Unter Verwendung immunologischer Methoden und neuerdings durch die Verwendung von molekularbiologischen Verfahren, wie den Einsatz von β -Glucuronidase-Fusions-Konstrukten mit Myrosinase-Promotorregionen, konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Myrosinasen in allen untersuchten Pflanzenspezies nahezu vollständig in Myrosinzellen und den Schließzellen lokalisiert sind (Thangstad et al., 2004; Husebye et al., 2002; Andréasson et al., 2001).

Unter Myrosinzellen versteht man Idioblasten, die innerhalb vernetzter vakuolärer Strukturen, den so genannten Myrosin-grains, die Myrosinasen enthalten (Thangstad et al., 1991; Andréasson et al., 2001). Diese Myrosinzellen sind in den Pflanzen der Ordnung Capparales weit verbreitet und gelten auch als eines ihrer taxonomischen Merkmale (Jørgensen, 1981).

In *Arabidopsis* beschränkt sich die Verbreitung der Myrosinzellen auf das Phloem-Parenchym (Andréasson et al., 2001). Im Gegensatz dazu werden die Glucosinolats in einem anderen Zelltyp akkumuliert, der erst vor wenigen Jahren entdeckt wurde und wegen seines hohen Schwefelgehaltes als S-Zelle bezeichnet wurde (Koroleva et al., 2000). Diese S-Zellen liegen in Gruppen außerhalb des Phloems in direkter Nachbarschaft zu den Myrosinzellen und weisen in ihrem Zellsaft Glucosinolat-Konzentrationen von mehr als 100 mM auf. Dies bedeutet, dass in *Arabidopsis* die Kompartimentierung von Glucosinolaten und Myrosinase auf dem Vorkommen in verschiedenen Zelltypen beruht.

In *Brassica napus* hingegen ist die Verbreitung der Myrosin-Zellen nicht nur auf das Phloemparenchym beschränkt, sondern dort liegen diese Idioblasten auch im Grundgewebe der gesamten Pflanze verstreut (Andréasson et al., 2001) und bilden gewebsspezifische Anhäufungen z.B. im Hypokotyl und Wurzelkortex (siehe 2.1.2).

Thangstad und Mitarbeiter vermuten, dass die Glucosinolats in Vakuolen der Myrosin-Zellen akkumuliert werden (2001). Allerdings haben die Autoren keine Erklärung dafür, wie eine derartige intrazelluläre Kompartimentierung oder vielleicht sogar Colokalisierung in den Pflanzen verwirklicht ist.

Wiederum eine andere Situation scheint in Samen und Sämlingen des Braunen Senfs (*Brassica juncea*) vorzuliegen. Kelly und Mitarbeiter haben gezeigt, dass in dieser Pflanze der größte Teil der Myrosinasen zwar in den Myrosinzellen lokalisiert ist, doch ein geringerer Anteil der Myrosinasen findet sich zusammen mit den Glucosinolaten und scheint in Aleuronzellen subzellulär kompartimentiert vorzuliegen (Kelly et al., 1998).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es bislang nicht gelungen ist, die zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Glucosinolaten, Myrosinasen und Ascorbinsäure umfassend zu klären, um die Funktionsweise der „Senfölbombe“ zu verstehen. Besonders die Lokalisierung der Glucosinolate und der Ascorbinsäure auf zellulärer Ebene erscheint im Vergleich zu dem Protein Myrosinase verhältnismäßig schwierig. Die Uneinheitlichkeit der Befunde aus den verschiedenen Spezies macht es zurzeit unmöglich, ein allgemeingültiges Modell zur Lokalisation des Glucosinolat-Myrosinase-Systems abzuleiten. Eher scheint es wahrscheinlich, dass es mehrere Formen der Lokalisierung und Kompartimentierung gibt. Damit einhergehend kann auch von unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Glucosinolate in verschiedenen Arten ausgegangen werden.

2.4 Hydrolyse der Glucosinolate

Wird die Integrität der pflanzlichen Gewebe z. B. durch Insektenfraß gestört und die Kompartimentierung aufgehoben, dann gelangen die reaktiven Komponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems miteinander in Kontakt, und die Hydrolyse der Glucosinolate wird eingeleitet. Aus den zunächst entstehenden Thiohydroximat-O-Sulfonaten generiert eine ganze Reihe von biologisch aktiven Komponenten, die im allgemeinen Sprachgebrauch auch unter dem Sammelbegriff Senföle zusammengefasst werden.

2.4.1 Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse

Unter Verwendung künstlicher Inhibitoren klärte die Arbeitsgruppe um Burmeister die biochemischen Mechanismen der Hydrolyse der Glucosinolate an einer kristallisierten Myrosinase aus *Sinapis alba* auf. Die Autoren konnten in diesem Kontext auch die Funktionsweise des Aktivators Ascorbinsäure zweifelsfrei belegen (Burmeister et al., 2000).

Es zeigte sich, dass sich die Myrosinasen und die nah verwandten β -O-Glucosidasen in ihren katalytischen Mechanismen sehr ähneln. Ebenso wie die Spaltung der cyanogenen Glucoside gliedert sich die Hydrolyse der Glucosinolate in zwei Teilreaktionen, den Glucosylierungs- und den Deglucosylierungs-Schritt (Abbildung 8 und 9).

Nachdem die Glucosinolate mittels der Substrat-Erkennungssequenzen in das aktive Zentrum des Enzyms eingebunden wurden (siehe 2.1.2), erfolgt durch die Carboxylgruppe eines in allen Myrosinasen hoch konservierten Glutamatrestes 409 (Glu409) ein nucleophiler Angriff auf das anomere Kohlenstoffatom der Glucosinolate (Abbildung 8). Der hierbei entstehende Enzym-Substrat-Komplex ist sehr kurzlebig. Unter Abgabe der Aglyca (Thiohydroximat-O-Sulfonate und Thiohydroxamat-O-Sulfonate), die eine sehr gute Abgangsgruppe darstellen, bildet sich mit der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Enzym und Glucosid das Glucosyl-Enzym als Zwischenprodukt.

Diesen ersten Abschnitt der Hydrolyse der Glucosinolate bezeichnet man auch als Glycosylierungs-Schritt:

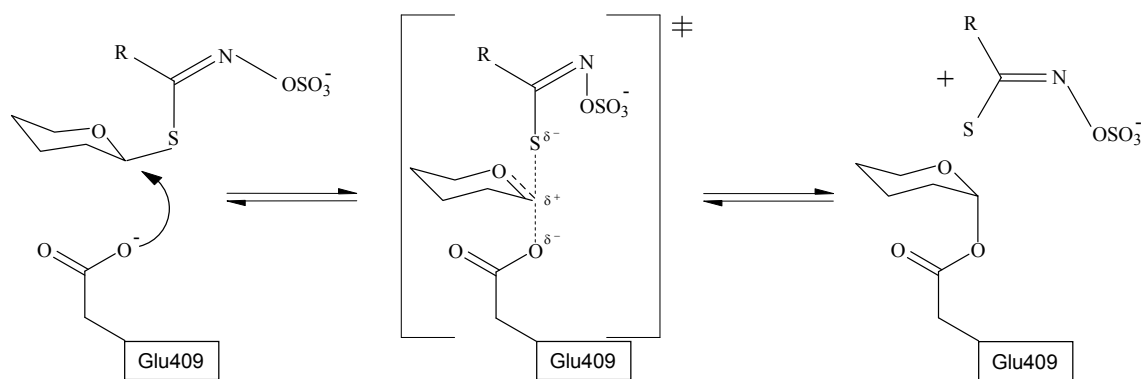


Abbildung 8: Glycosylierungs-Schritt der enzymatischen Hydrolyse der Glucosinolate

Im ersten Schritt der enzymatischen Hydrolyse der Glucosinolate wird zunächst ein instabiler Enzym-Substrat-Komplex gebildet, der rasch unter Abgabe des Aglycons zum Glucosyl-Enzym weiter reagiert (nach Burmeister et al., 2000).

Im zweiten Abschnitt, dem Deglycosylierungs-Schritt (Abbildung 9), werden durch das Austreten des Aglycons aus dem aktiven Zentrum des Enzyms der Eintritt und das Binden eines Ascorbats ermöglicht. Dieses Ascorbat vermag als katalytische Base fungierend den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das anomere Kohlenstoffatom des Glycosylrestes zu vermitteln. Die von Burmeister et al. durchgeführten Experimente zeigten, dass die in den letzten Jahrzehnten kontrovers diskutierte Funktion der Ascorbinsäure tatsächlich darin besteht, als Cofaktor die (partielle) Deprotonierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum des Enzyms zu katalysieren, so dass letztendlich der zweite Schritt der Hydrolyse, die Deglycosylierungs-Reaktion, beschleunigt abläuft (Burmeister et al., 2000). Nach der Hydroxylierung des Glycosylrestes verlassen Glucose und die Ascorbinsäure das aktive Zentrum und das Enzym kann eine erneute Hydrolyse einleiten.

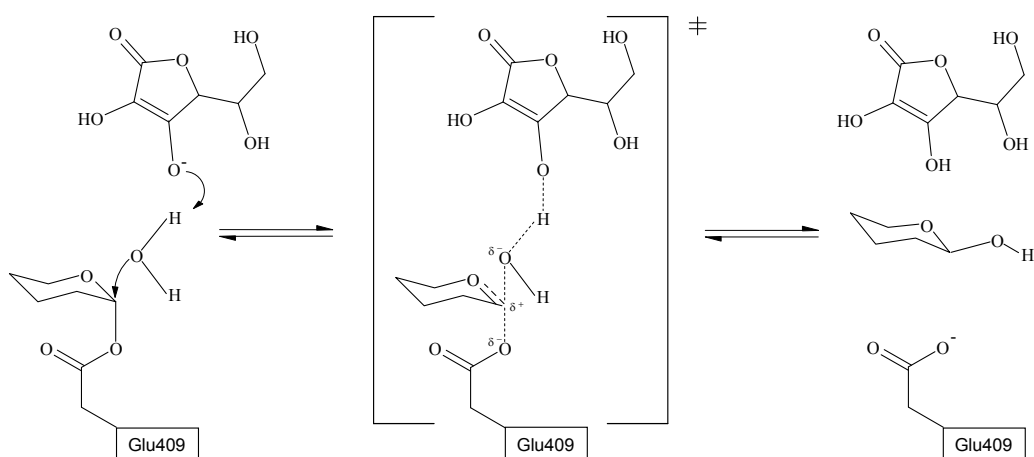


Abbildung 9: Deglycosylierungs-Schritt der enzymatischen Hydrolyse der Glucosinolate

Im zweiten Schritt der enzymatischen Hydrolyse der Glucosinolate vermittelt Ascorbinsäure den nukleophilen Angriff eines Wassermoleküls auf das anomere C-Atom des Glucosylrestes, Glucose und Ascorbinsäure werden freigesetzt und das aktive Zentrum des Enzyms ist wieder reaktionsbereit (nach Burmeister et al., 2000).

Somit beruht die Aktivierung der Myrosinasen darauf, dass die Ascorbinsäure als katalytische Base wirkt und nicht als Reduktionsmittel, wie man vielleicht vermuten könnte. Im Vergleich zu den β -O-Glucosidasen ersetzt die Ascorbinsäure im aktiven Zentrum der Myrosinasen den in den β -O-Glucosidasen als katalytische Base agierenden Glutamatrest (Glu187) (Burmeister et al., 2000). Dieser katalytisch wirkende Glutamatrest ist im aktiven Zentrum der Myrosinasen nicht mehr vorhanden. Es wird angenommen, dass er in Folge einer Punktmutation durch einen Glutaminrest (Gln187) ausgetauscht wurde (Burmeister et al, 2000).

Wie bereits in Kapitel 2.2.3 dargestellt, bezeichneten Shikita und Mitarbeiter (1999) die Aktivierung der Myrosinasen durch Ascorbinsäure analog zur unkompetitiven Inhibierung als unkompetitive Aktivierung und schlossen aus ihren erstellten Enzymkinetiken, dass die Ascorbinsäure erst im zweiten Schritt der enzymatischen Reaktion, dem Deglycosylierungsschritt, an den Enzym-Substrat-Komplex binden müsste (siehe 2.2.3). Die hier aufgeführten Ergebnisse der Röntgenstrukturanalysen bestätigen damit die kinetischen Untersuchungen.

Überdies lässt sich anhand des vorgestellten Modells auch die leichte Abnahme der Myrosinase-Aktivität bei hohen Ascorbinsäure-Konzentrationen erklären (siehe Kapitel 2.2.3): Da sich die Bereiche zur Bindung des Aglycons und der Ascorbinsäure im aktiven Zentrum der Myrosinasen überschneiden und somit die Glucosinolate und die Ascorbinsäure nicht gleichzeitig gebunden werden können, stehen beide Substanzen bei hohen Ascorbinsäure-Konzentrationen verstärkt in Konkurrenz zueinander. Dies würde die zu beobachtende leichte kompetitive Inhibierung der Myrosinasen erklären.

Der unterschiedliche Grad der Aktivierbarkeit der einzelnen Myrosinasen (siehe Kapitel 2.2.3), lässt sich durch unterschiedliche Überschneidungen der Bindungsbereiche für das Glucosinolat und die Ascorbinsäure in den aktiven Zentren der verschiedenen Myrosinasen erklären.

Die bei manchen Myrosinasen auftretende katalytische Grundaktivität auch in Abwesenheit von Ascorbinsäure, wie z. B. bei der von *Sinapis alba*, erklären die Autoren damit, dass aufgrund der leicht variierenden strukturellen Begebenheiten im aktiven Zentrum der Myrosinasen die katalytische Wirkung der Ascorbinsäure nicht bei allen Myrosinasen essentiell sei, bzw. durch andere Anionen induziert werden kann.

2.4.2 Bildung der Senföle

Im Unterabschnitt „Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse“ wurde aufgezeigt, dass schon im ersten Schritt der Hydrolyse der Glucosinolate deren Aglyca freigesetzt werden (Thiohydroximat-O-Sulfonate und Thiohydroxamat-O-Sulfonate). In Abhängigkeit von der Seitenkette, den vorliegenden Reaktionsbedingungen und der Verfügbarkeit zusätzlicher Proteine und Cofaktoren kann aus den instabilen Thiohydroximat-O-Sulfonaten unter Sulfatabspaltung eine ganze Reihe von Folgeprodukten entstehen. Dies sind in erster Linie

Isothiocyanate, Thiocyanate, und Nitrile, in einigen Fällen aber auch Epithionitrile und Oxazolidin-2-Thione (Abbildung 10).

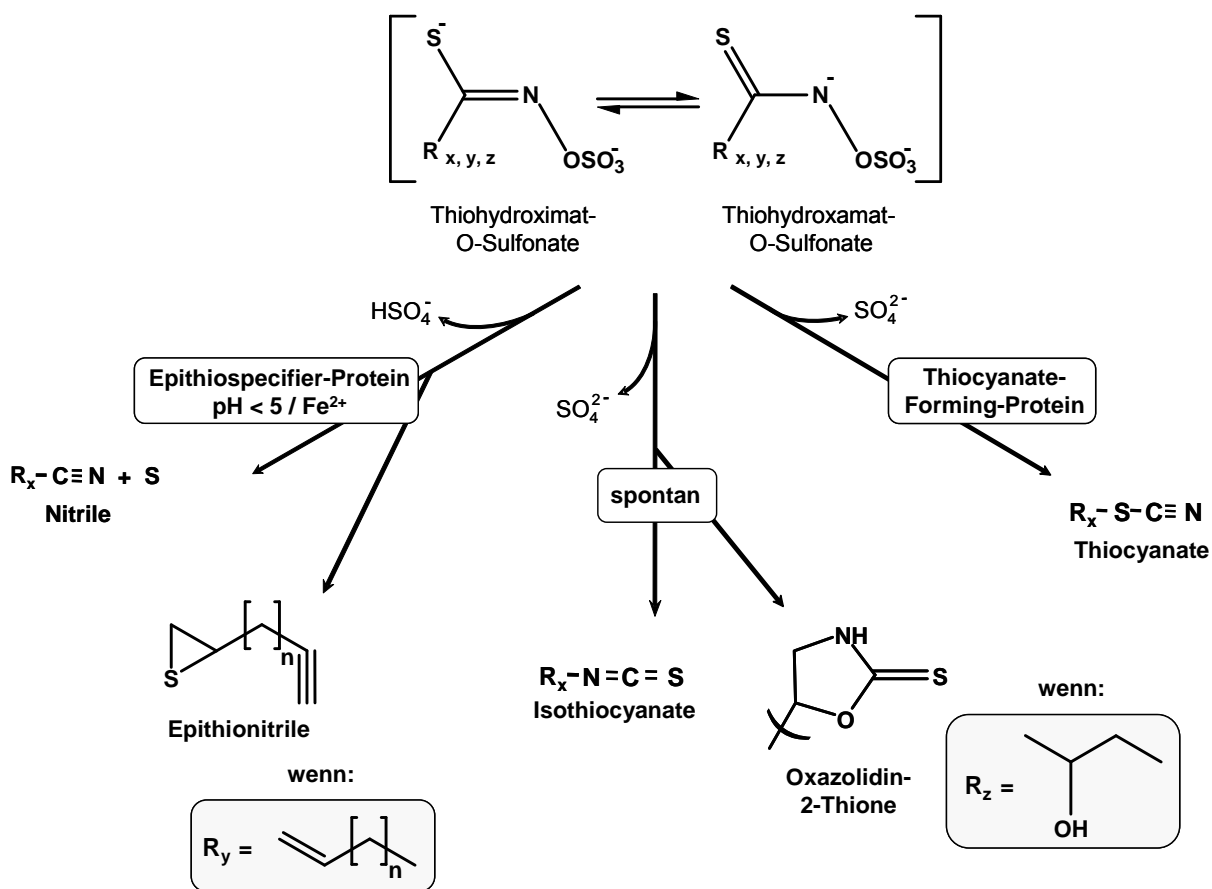


Abbildung 10: Hauptprodukte aus der Hydrolyse der Glucosinolate

Die während der enzymatischen Hydrolyse der Glucosinolate freigesetzten Aglyca (Thiohydroximat-O-Sulfonate) sind instabil und reagieren zu zahlreichen Folgeprodukten weiter. Als Hauptprodukte treten vor allem Isothiocyanate auf. Handelt es sich bei den eingehenden Glucosinolaten um β -Hydroxy-Alkenyl-Glucosinolate (R_z), dann entstehen instabile Isothiocyanate (nicht gezeigt), die sich zu Oxazolidin-2-Thionen umlagern. Unter Anwesenheit von Epithiospecifier-Proteinen (ESP), bei niedrigen pH-Werten oder der Anwesenheit von Fe^{2+} -Ionen entstehen Nitrile oder Epithionitrile. Letztere werden aus Glucosinolaten mit endständigen Doppelbindungen in der Seitenkette gebildet. Zur Bildung von Thiocyanaten kommt es bei Anwesenheit von „Thiocyanat-formenden-Proteinen“ (TFP).

Somit können aus den ohnehin schon vielen in Pflanzen nachgewiesenen Glucosinolaten (rund 120), noch wesentlich mehr unterschiedliche biologisch aktive Substanzen zum Teil sogar gezielt gebildet werden, die im ökologischen Kontext der Pflanzen zahlreiche Funktionen erfüllen.

Isothiocyanate

In der wissenschaftlichen Literatur ist ausgeführt, dass aus den Thiohydroximaten am häufigsten Isothiocyanate gebildet werden (Bones und Rossiter, 2006). Der Grund hierfür ist darin zu sehen, dass die Reaktionen, die zu den Isothiocyanaten führen, unter den in den Pflanzen vorherrschenden Bedingungen im Zuge einer Lossen-Umlagerung spontan erfolgen. Hierbei wird nach der Abspaltung der Sulfatgruppe die Seitenkette vom C-Atom des Thiohydroximats auf das benachbarte N-Atom umgelagert und eine Doppelbindung zu dem verbleibenden Sulfid wird ausgebildet. Entsprechend der dargestellten Zusammenhänge entsteht aus dem Benzylglucosinolat der Kapuzinerkresse als Hauptabbauprodukt das Benzylisothiocyanat.

Ist das C-2-Atom der Seitenkette hydroxyliert (β -Hydroxy-Alkenyl-Glucosinolate), dann entstehen instabile Isothiocyanate, die zu Oxazolidin-2-Thionen zyklisieren. Ein prominenter Vertreter dieser Klasse von Abbauprodukten ist das Goitrin, das bei Säugetieren die Ausbildung einer krankhaft vergrößerten Schilddrüse, den so genannten Kropf, fördert (Griffiths et al., 1998).

Werden Indolylglucosinolate durch die Myrosinasen hydrolysiert, dann entstehen instabile Isothiocyanate die zahlreichen Folgereaktionen unterliegen. Als Endprodukte können Indolmethanole, bei Anwesenheit von Ascorbinsäure Ascorbigene und verschiedene Oligomere entstehen (Agerbirk et al., 1998; Buskov et al., 2000).

Thiocyanate

Thiocyanate können aus Thiohydroximaten nur dann entstehen, wenn sich aus den Seitenketten stabile Carbokationen bilden lassen, die einen elektrophilen Angriff auf das Sulfid-Anion erlauben (Luthy und Benn, 1977). Im Zuge dieser Reaktion wird die positiv geladene Seitenkette auf das S-Atom umgelagert, und es entsteht ein endständiges Nitril. Thiocyanate können daher nur aus einer begrenzten Zahl von Glucosinolaten gebildet werden, dazu zählen lediglich Benzyl-, Allyl- und Methylsulfinylbutyl-Glucosinolat.

Bereits vor rund fünfzig Jahren deuteten erste experimentelle Befunde darauf hin, dass es in Pflanzen einen enzymatischen Faktor geben müsste, der neben den hydrolytischen Myrosinasen die Bildung von Thiocyanaten aus den entstehenden Aglyca katalysiert (Gmelin und Virtanen, 1959; Saarivirta, 1973).

Erst im Jahr 2006 gelang es Burow und Mitarbeitern über Sequenzanalogien zum bereits bekannten Epithiospecifier-Protein (siehe auch „Nitrile und Epithionitrile“) ein Thiocyanat-Forming-Protein (TFP) in *Lepidium sativum* zu identifizieren (Burow et al., 2006). Die biochemischen Mechanismen, die der entsprechenden enzymatisch katalysierten Bildung der Thiocyanate zugrunde liegen, konnten bislang aber noch nicht aufgeklärt werden.

Nitrile und Epithionitrile

Erste Hinweise darauf, dass auch Nitrile, in diesem Fall Epithionitrile, aus Glucosinolaten freigesetzt werden können, stammen von VanEtten und Mitarbeitern (1966) und Daxenbichler und Mitarbeitern (1968). Diese Autoren vermuteten, dass die Bildung von Nitrilen ausschließlich vom pH-Wert (<3) und der Verfügbarkeit von Fe^{2+} -Ionen abhängig sei.

Jedoch zeigte sich bald, dass es Proteine gibt („Epithiospezifische Proteine“), die aus den instabilen Thiohydroxamat-O-Sulfonaten bevorzugt die korrespondierenden Nitrile oder Epithionitrile entstehen lassen, anstatt der sich sonst spontan bildenden Isothiocyanate (Tookey, 1973; Foo et al., 2000; Bernardi et al., 2000).

Epithionitrile werden aus Glucosinolaten gebildet, die Seitenketten mit einer endständigen Doppelbindung aufweisen.

Der katalytische Mechanismus, der den Epithiospezifischen-Proteinen zugrund liegt, konnte indes noch nicht aufgeklärt werden.

2.5 Bedeutungen des Glucosinolat-Myrosinase-Systems

Für die Glucosinolate lassen sich eine ganze Reihe sehr unterschiedlicher Funktionen ableiten, die in Zusammenhang mit der Ökologie und dem Wachstum der Pflanzen stehen. Vornehmlich die Abbauprodukte der Glucosinolate, die Isothiocyanate, übernehmen wichtige Funktionen in den ökologischen Wechselwirkungen der Pflanzen, hierzu gehören die Abwehr von Generalisten, die Attraktion von Spezialisten und weitere Funktionen in den komplexen Beziehungen zu symbiotischen und konkurrierenden Organismen.

Und auch in der Regulation des Wachstums und phototroper Reaktionen sind es wiederum die Abbauprodukte der Glucosinolate, die biologische Aktivität aufweisen. Darüber hinaus haben die Glucosinolate in vielerlei Hinsicht eine Bedeutung für den Menschen.

2.5.1 Ökologische Aspekte

Abwehr von Generalisten

Das Glucosinolat-Myrosinase-System spielt in vielen ökologischen Wechselwirkungen der Pflanzen, die mit der Abwehr in Verbindung stehen, eine zentrale Rolle. Allerdings beruhen sämtliche beobachtete biologische Aktivitäten auf aus Glucosinolaten freigesetzten Senfölen. Bislang ist kein Fall bekannt, bei dem die ökologischen Funktionen auf intakte Glucosinolate zurückzuführen sind (siehe Kapitel 2.4.2).

Als Komponenten einer präformierten Abwehr, ähnlich den cyanogenen Glucosiden, wurden für die Glucosinolate bzw. deren zahlreiche Hydrolyseprodukte, eine ganze Reihe mutmaßlicher Abwehrfunktionen ausgemacht. Die Senföle wirken auf eine Vielzahl von generalistischen Fraßfeinden, wie z.B. Vögel, Insekten und Schnecken, abschreckend und toxisch und zeigen auch eine wachstumshemmende Wirkung auf viele pathogene Mikro-

organismen, wie Bakterien und Pilze (Chew, 1988; Glen et al., 1990; Buskov et al., 2002; Noret et al., 2005; Ulmer et al., 2001; Tierens et al., 2001; Mari et al., 2002). Die Senföle tragen somit zum Schutz und zur Fitness der Pflanzen bei.

Die abschreckende Wirkung der Senföle lässt sich meist schon allein auf ihren scharfen Geruch und Geschmack zurückführen. Des Weiteren treten nach dem Kontakt mit Senfölen auch lokale Reizwirkungen an epidermalen Geweben und empfindliche Schleimhäuten auf. Im Gegensatz dazu sind die ebenfalls zu beobachtenden toxischen Wirkungen auf Fraßfeinde und Mikroorganismen kaum geklärt. Die bakterio- und fungitoxische Wirkung der Isothiocyanate ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Reaktionen mit freien Sulfhydrylgruppen von Enzymen stattfinden, in deren Folge wichtige Funktionen des mikrobiellen Stoffwechsels, wie z.B. der Atmung, gehemmt werden (Drobnica und Demjanenko, 1972; Drobnica und Gemeiner, 1976; Kawakishi und Kaneko, 1987).

Attraktion von Spezialisten



Abbildung 11: Raupen des Kohlweißlings (*Pieris brassicae*) auf Kapuzinerkresse

Die Raupen dieses auf Kohl (*Brassica oleracea*) spezialisierten Insektes akzeptieren auch die glucosinolathaltigen Blätter der Kapuzinerkresse als Nahrung (Angela Lahee, 2007).

Andererseits gibt es aber auch auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierte Insekten, wie z. B. die Kleine Kohlflye (*Delia radicum*), deren befruchtete Weibchen gezielt Kohlpflanzen (*Brassica oleracea*) anfliegen. Offensichtlich sind diese Fliegen in der Lage schon aus weiter Entfernung glucosinolathaltige Pflanzen an den freigesetzten Senfölen, die z. B. im Zuge von Mikro-Verletzungen gebildet werden, zu erkennen (Hawkes und Coaker, 1976; De Jong und Städler, 1999). Des Weiteren stimulieren die Glucosinolate in Verbindung mit einigen anderen Faktoren auf der Blattoberfläche der Kohlpflanzen auch die Oviposition dieser Tierart (Roessingh et al., 1992; Hurter et al., 1999).

Weitere ökologische Wechselwirkungen zwischen glucosinolathaltigen Pflanzen und anderen spezialisierten Insekten, wie z. B. der Kohlblattlaus (*Brevicoryne brassicae*), den verschiedenen Kohlweißlingsarten (*Pieris rapae* und *Pieris brassicae*, Abbildung 11) und der Kohlmotte (*Plutella xylostella*), werden ausführlich in der wissenschaftlichen Fachliteratur diskutiert (Miles et al., 2005; Gabrys und Tjallingii, 2002; Agelopoulos und Keller, 1994; Griffiths et al., 2001).

Weitere ökologische Wirkungen

Für verschiedene Isothiocyanate aber auch intakte Glucosinolate wurden allelopathische Wirkungen beschrieben (Feeny, 1976; Brown und Morra, 1995; Bialy et al., 1990). So untersuchten z.B. Bialy et al. (1990) die keimungshemmende Wirkung von 16 verschiedenen Glucosinolaten und den entsprechenden Isothiocyanaten auf Weizensamen. Bei dieser Studie stellten die Autoren fest, dass die intakten Glucosinolate mit Ausnahme des Glucobrassicins (3-Indolylmethylglucosinolat) keine allelopathischen Wirkungen zeigten. Im Gegensatz dazu wirkten alle Isothiocyanate keimungshemmend auf die Weizensamen. Die stärkste allelopathische Wirkung besaß das 2-Phenylethylisothiocyanat, das schon bei einer Konzentration von 500 ppm die Keimung des Weizens vollständig unterband.

Auch fungitoxische Wirkungen der Senföle sind beschrieben (z. B. Mari et al., 2002). Einige Autoren nehmen an, dass die Senföle auch die Wechselwirkungen mit symbiotischen (mutualistischen) Mikroorganismen beeinflussen, und deshalb die verschiedenen Brassicaceen Arten keine Mykorrhizen ausbilden. Diese Annahme wurde von Vierheilig und Mitarbeitern (2000) bestätigt. Die Autoren wiesen nach, dass die Hydrolyseprodukte aus den in den Wurzeln enthaltenen aromatischen Glucosinolaten und Indolglucosinolaten die Ausbildung mykorrhizaler Strukturen unterbinden (Vierheilig et al., 2000). Allerdings gibt es aber auch Hinweise darauf, dass Hydrolyseprodukte der Indolglucosinolate aus Wurzelexsudaten verschiedener Brassicaceen das Wachstum bestimmter Ektomykorrhiza-Pilze (z. B. *Pisolithus tinctorius*) zu fördern vermögen (Zeng et al., 2003). Laut den Autoren stehen die untersuchten Pilzarten selbst aber nicht in symbiotischer Beziehung zu den Brassicaceen, sondern zu verschiedenen Bäumen, so dass die dargestellten Zusammenhänge erklären könnten, warum es in Südchina ein Brauch ist, unter jungen Obstbäumen Kreuzblütler zu pflanzen (Zeng et al., 2003).

2.5.2 Wachstumsregulation

Bildung von Auxinen aus Indol-Glucosinolaten

In Pflanzen sind zwei Hauptsynthesewege zum Phytohormon Indol-3-Essigsäure (IES) realisiert, der Indol-3-Acetonitril-Weg und der Indol-Pyruvat-Weg. In einigen Arten der Brassicaceen wurde kürzlich eine dritte Variante zur Bildung von Auxinen ausfindig gemacht. Die Indolglucosinolate werden durch die Myrosinase unter Anwesenheit des

Epithiospecifizier-Proteins zu Indol-3-Acetonitril umgesetzt, das in den Indol-3-Acetonitril-Weg eingespeist wird und mittels Nitrilase zu IES hydrolysiert wird (Bartel und Fink, 1994; Hull et al., 2000). Inwieweit diese alternative Synthese von IES *in vivo* tatsächlich eine Rolle bei der Auxin-Biosynthese spielt, ist bislang ungeklärt, doch es ist zurzeit nicht auszuschließen, dass die Indolglucosinolate auf diese Weise - neben ihrer ökologischen Funktion - auch in die Regulation von Wachstumsprozessen eingebunden sind.

Phototropismus

Zu den wachstumsregulierenden Wirkungen der Glucosinolate müssen auch die phototropen Effekte gezählt werden. In *Raphanus sativus* werden aus 4-Methylthio-3-Butenylglucosinolat Raphanusanine freigesetzt (Hasegawa et al., 2000), siehe auch Kapitel 2.1.4. Die Raphanusanine werden bei seitlich einfallender Beleuchtung auf der beleuchteten Seite des Hypokotyls gebildet, inhibieren dort lokal das Wachstum und bewirken somit eine Krümmung des Sprosses zum Licht.

2.5.3 Glucosinolathaltige Pflanzen in der Nutzung durch den Menschen

Dieses Kapitel präsentiert unterschiedliche Aspekte der Nutzung glucosinolathaltiger Pflanzen durch den Menschen. Vor allen Dingen werden die Themenkomplexe Ernährung, Gesundheit und Landwirtschaft angeschnitten, wobei in den einzelnen Abschnitten insbesondere auf die jeweilige Bedeutung der Physiologie des Glucosinolat-Myrosinase-Systems eingegangen wird.

Glucosinolathaltige Pflanzen als Nahrungsmittel

Schon seit Jahrtausenden spielen die glucosinolathaltigen Pflanzen eine wichtige Rolle in der menschlichen Ernährung. Besonders in Mitteleuropa waren die relativ anspruchslosen und winterharten Gemüse wie Weißkohl und Steckrüben für viele Menschen mit Sicherheit die letzten Nahrungs- und Vitaminreserven in harten und entbehrungsreichen Wintern.

Die Hydrolyseprodukte der Glucosinolate tragen ganz wesentlich zum Geschmack und Aroma vieler Nahrungsmittel und Würzkräuter bei. So stammt z. B. der brennend scharfe Geschmack des Senfs und des Meerrettichs von dem flüchtigen Allylisothiocyanat, das sich vom Sinigrin (2-Propenylglucosinolat) ableitet. Auch der angenehme, teils leicht bittere, Geschmack vieler Brassicaceen-Gemüse wie Brokkoli, Weißkohl, Blumenkohl, Rosenkohl und Rettich wird von den zahlreichen Senfölen geprägt, die erst nach dem Zerkleinern, Reiben oder Schneiden aus den pflanzlichen Geweben freigesetzt werden. Die eher bitteren Nuancen der menschlichen Geschmacksempfindungen haben ihre Ursache in den Hydrolyseprodukten der Indol- und Alkenylglucosinolate (Engel et al., 2002; Holst und Williamson, 2004).

Antikanzerogene Eigenschaften

Bereits vor rund 50 Jahren zeigten Experimente an Ratten, dass aus Glucosinolaten freigesetzte Isothiocyanate hemmende Wirkungen auf die Entwicklung von Krebstumoren ausüben (Sasaki, 1963; Sidransky et al., 1966). Im Verlauf der letzten Jahrzehnte bestätigten sich diese Ergebnisse nicht nur in *in vitro*-Zellsystemen und Tierversuchen, sondern auch in zahlreichen epidemiologischen Studien (Verhoeven et al., 1997).

So zeigte sich, dass die Hauptwirkungsweise der Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile darin liegt, dass Enzyme zur Zellentgiftung induziert werden. Hierbei handelt es sich vornehmlich um die so genannten Phase II-Enzyme, wie Glutathion-S-Transferasen, NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktasen, Glucuronosyl-Transferasen und Sulfotransferasen, die Fremdstoffe in diesem Fall die Kanzerogene mit hydrophilen Seitenketten konjugieren, um sie leichter aus dem Körper ausschleusen zu können (Holst04). Die erläuterten Zusammenhänge erklären die gute Eignung glucosinolathaltiger Gemüsesorten zur Prävention von Krebserkrankungen, die inzwischen auch durch epidemiologische Studien bestätigt werden konnte (Hooper und Cassidy, 2006).

Zudem wirken viele Abbauprodukte der Glucosinolate als indirekte Antioxidantien und erhöhen die Aktivität der γ -Glutamylcystein-Lyase, wodurch der zelluläre Glutathion-Spiegel steigt und allgemein ein erhöhter Oxidationsschutz der zellulären Strukturen gewährleistet ist (Mulcahy et al., 1997).

Andere Isothiocyanate leiteten in *in vitro*-Experimenten die Apoptose verschiedener Krebszelllinien ein und blockierten die Zellzyklus-Aktivität (Chen et al., 2002, Thornalley, 2002). Ein gutes Beispiel hierfür ist das in den letzten Jahren besonders intensiv untersuchte Sulforaphan. Hierbei handelt es sich um das Isothiocyanat des in Brokkoli enthaltenen 4-Methylsulfinyl-Butyl-Glucosinolats (Zhang02). Es weist ausgesprochen starke antikanzerogene Eigenschaften auf. Darüber hinaus wird berichtet, dass es auch das Wachstum von *Helicobacter pylori* hemme und somit der Gastritis und der Ausbildung von Magenkrebs entgegen wirke (Fahey et al., 2002). Hier stehen allerdings noch weitere verifizierende Untersuchungen aus.

Erst kürzlich wurde mit molekularbiologischen Methoden versucht die Gehalte an ernährungsphysiologisch wertvollen Glucosinolaten in Brokkoli zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurden „quantitative trait loci“ (QTL) aus *Brassica villosa*, einer nah verwandten Wildpflanze des Brokkolis in das Genom des Brokkolis inseriert. Als Resultat enthielt der transformierte Brokkoli wesentlich höhere Glucosinolat-Gehalte und bildete zudem aus den Glucosinolaten auch anteilig wesentlich mehr Sulforaphan statt der korrespondierenden Nitrile (Mithen et al., 2003).

Der „World Cancer Research Fund“ kommt zu dem Schluss, dass der regelmäßige Verzehr von Brassicaceen-Gemüse das Risiko zur Entstehung von Darm- und Schilddrüsenkrebs-

erkrankungen signifikant vermindern kann und durch eine Kombination mit anderen Gemüsesorten die Krebsprophylaxe auch auf weitere Körperbereiche ausgeweitet werden kann (Hooper und Cassidy, 2006).

Strumigene Wirkungen

Einige Hydrolyseprodukte der Glucosinolate fördern bei Säugetieren auch die Ausbildung von Kröpfen (Kropf=Struma). Am bekanntesten ist in diesem Zusammenhang das Hauptglucosinolat des Raps Progoitrin (2-Hydroxy-3-Butenylglucosinolat) geworden, aus dem nach der Hydrolyse das Goitrin (5-Vinylloxazolidin-2-Thion) gebildet wird (siehe Kapitel 2.4.2). Der Name Goitrin leitet sich von der englischen Bezeichnung für Kropf „goiter“ ab.

Die strumigene (kropfbildende) Wirkung des Goitrins basiert auf der direkten Hemmung der Bildung des Schilddrüsenhormons Thyroxin. Der hieraus resultierende Mangel an diesem Hormon verursacht ein verstärktes Wachstum des Schilddrüsengewebes, in dessen Folge sich der Kropf ausbildet (Griffiths et al., 1998). Auch Isothiocyanate fördern die Kropfbildung, doch deren Wirkung besteht darin, dass sie mit Iodid um die Einlagerung in die Schilddrüse konkurrieren, wodurch ebenfalls ein Thyroxinmangel und ein verstärktes Wachstums der Schilddrüse folgen (Griffiths et al., 1998).

Für den Menschen stellen die strumigenen Hydrolyseprodukte der Glucosinolate bei einer ausgewogenen Ernährungsweise jedoch keinerlei Gefahr dar. Probleme treten allerdings im Nutztierbereich bei einer einseitigen Verfütterung von Rapspressrückständen aus der Rapsölerzeugung auf. Um das Verfüttern dieser aufgrund ihres hohen Proteingehaltes prinzipiell gut als Futtermittel geeigneten Abfallprodukte zu ermöglichen, wurden Rapssorten gezüchtet, die besonders niedrige Glucosinolat-Gehalte aufweisen (Fahey et al., 2001). Diese Rapssorten wie z. B. „double low“ oder „00“-Varietäten dürfen im Durchschnitt nicht höhere Glucosinolat-Gehalte als 10 µmol/g in vegetativen Geweben und 20 µmol/g in Samen aufweisen (Schnug, 1990). Entsprechende Pressrückstände können problemlos als Viehfutter genutzt werden.

Biofumigation

Unter Biofumigation versteht man das Einbringen von glucosinolathaltigem Pflanzenmaterial in den Ackerboden mit dem Zweck, dass die bei der Hydrolyse der Glucosinolate entstehenden Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile in das Erdreich ausdünsten und die Mikroflora und Fauna des Bodens positiv beeinflussen. Auf diese Weise können das Auskeimen von Unkräutern und auch die Entwicklung von schädlichen Nematoden und Mikroorganismen gezielt eingedämmt werden.

Die Anwendung der Biofumigation in rotierenden Bewirtschaftungssystemen und zur Gründüngung ermöglicht es, den Einsatz an chemisch-synthetischen Pestiziden zu reduzieren. Hierdurch können sowohl Kosten eingespart werden, als auch die Umwelt entlastet werden.

Zudem verbessert sich allein durch den Eintrag des organischen Materials die Bodenqualität nachhaltig (Kirkegaard und Matthiessen, 2006; Smith et al., 2004; Brown und Morra, 1995).

2.6 Transport der Glucosinolate

Seit längerem wird angenommen, dass Glucosinolate innerhalb der Pflanzen verlagert werden. Erste Hinweise lieferten Lykkesfeldt und Möller 1993, die feststellten, dass in *Tropaeolum majus*-Pflanzen die Glucotropaeolin-Gehalte in den reifenden Samen langsam zunehmen, obwohl sich in den Samen die Enzyme zur Biosynthese nicht nachweisen ließen (Lykkesfeldt und Möller, 1993). Die Autoren schlossen aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur *de novo*-Synthese in den Samen, dass die Glucosinolate vermutlich aus anderen Bereichen der Pflanze dorthin verlagert werden. Da sie lediglich in den Blättern biosynthetisch aktive Microsomen-Fraktionen fanden, folgerten sie weiter, dass das Glucotropaeolin von den Blättern - dem einzig möglichen Ort zur Synthese - zu den Blüten und in die reifenden Samen verlagert wird.

Des Weiteren stellten Bloem und Mitarbeiter 2001 fest, dass der Glucosinolat-Gehalt in den Blättern der Kapuzinerkresse vor der Blühperiode mit einem Gehalt von rund 70 µmol/g TG am höchsten ist. Während der Blüh- und Samenreifephase nimmt er um rund 20 % ab und steigt erst nach der Samenreife wieder leicht an (Bloem et al., 2001). Diese Ergebnisse wurden dahingehend gedeutet, dass in *Tropaeolum* aus den Blättern Glucosinolate exportiert und anschließend in den Samen akkumuliert werden.

Auch in verschiedenen Brassicaceaeen zeigen sich vergleichbare Verteilungsmuster der Glucosinolate, so dass angenommen wird, dass Glucosinolate generell einem Ferntransport innerhalb der Pflanzen unterliegen (Du und Halkier, 1998; Brown et al., 2003). Allerdings sind die Einzelheiten des Transports, wie z.B. der Transportweg, die Transportform und Einbindung von spezifischen Transportern, bislang völlig unbekannt.

Erste Hinweise zum Weg und der Transportform der Glucosinolate lieferte eine Studie, die sich eines Ansatzes aus der Bioinformatik bediente und anhand des so genannten Kleier-Modells aufzeigte, dass sowohl die Verlagerung von intakten Glucosinolaten als auch von Desulfoglucosinolaten über das Phloem aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften denkbar wäre (Brudenell et al., 1999).

Eine Verlagerung von Glucosinolaten als Desulfoglucosinolate hätte den entscheidenden Vorteil, dass unerwünschte Hydrolysen durch Myrosinasen, die vor allem im Bereich der Leitbündel lokalisiert sind, ausgeschlossen werden könnte, da Myrosinasen die Desulfoglucosinolate als Substrate nicht umsetzen.

Allerdings lagen Ende der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts bereits zwei Arbeiten vor, in deren Zuge aus Aphiden gewonnener Phloemsaft auf die enthaltenen Glucosinolate hin untersucht wurde (Merritt, 1996; Weber et al., 1986). So ermittelte z.B. Merritt (1996) für den

Phloemsaft von *Brassica nigra* Sinigrin-Konzentrationen von mehr als 10 mM für junge Blätter und lediglich 1-3 mM für ausgewachsene und senescente Blätter. Jedoch analysierten sowohl Stewart als auch Weber die aus den Glucosinolaten generierten Desulfoglucosinolate mittels HPLC. Somit konnte zwar eindeutig gezeigt werden, dass im Phloemsaft Glucosinolate enthalten sind. Die gewählte Vorgehensweise erlaubt es aber nicht, zwischen Desulfoglucosinolaten, intakten Glucosinolaten oder anderen möglichen Transportformen im Phloem zu differenzieren.

Im Jahr 2001 griffen Chen et al. die offen gebliebenen Fragestellungen erneut auf und führten Studien an *Arabidopsis thaliana* mit radioaktiv markierten Tracern durch. Erstmals gelang es, die zuvor nur auf Mutmaßungen beruhende These einer Verlagerung von Glucosinolaten innerhalb der Pflanzen eindeutig nachzuweisen. Nach der Applikation von [¹⁴C]Tyrosin und auch von [¹⁴C]p-OH-Benzylglucosinolat auf die Rosetten-Blätter blühender *Arabidopsis*-Pflanzen, konnten die Autoren radioaktiv markiertes p-OH-Benzylglucosinolat in den reifen Samen nachweisen.

Des Weiteren wurden Phloemexsudate aus den abgeschnittenen Stängeln der Blätter gewonnen und auf enthaltene Glucosinolate untersucht. Zur Analytik des Glucosinolat-Spektrums verwendete die Arbeitsgruppe um Chen ebenfalls eine HPLC/MS-Methode, bei der enzymatisch gewonnene Desulfoglucosinolate aufgetrennt werden. Im Gegensatz zu allen vorherigen Ansätzen wurden aber nicht nur desulfatisierte Extrakte mittels HPLC/MS analysiert sondern im Vergleich dazu auch die jeweils unbehandelten. Hierbei zeigte sich, dass nur in den desulfatisierten Extrakten Desulfoglucosinolate enthalten sind und nicht in den unbehandelten. Hieraus folgerten die Autoren, dass ausschließlich intakte Glucosinolate im Phloem verlagert werden und nicht deren Desulfoformen.

Im Gegensatz hierzu gibt es Hinweise darauf, dass bei der Verlagerung von Glucosinolaten in die Samen von *Brassica napus* Desulfoglucosinolate eingebunden sein könnten. Zum einen sind isolierte Rapssamen befähigt Desulfoglucosinolate aus dem umgebenen Medium aufzunehmen und zum anderen weisen sie auch PAPS:Desulphoglucosinolat-Sulfotransferase-Aktivität auf und können diese in die korrespondierenden Glucosinolate umsetzen (Toroser et al., 1995; Thangstad et al., 2001). Thangstad und Mitarbeiter vermuten für die Desulfoglucosinolate eine Rolle im Transport zu den Myrosin-Zellen, wo sie dann für die Lagerung zu Glucosinolaten sulfatisiert werden.

Auch die molekularen Mechanismen des Glucosinolat-Transportes sind nicht bekannt. Bis heute gelang es nicht, entsprechende Transporter zu identifizieren. Eine Reihe biochemischer Studien, die z.B. an Protoplasten und Mikrosporen-Embryos von *Brassica napus* durchgeführt wurden, weisen darauf hin, dass es sich um einen für Glucosinolate spezifischen, protonenabhängigen Symporter handeln muss (Gijzen et al., 1989; Chen und Halkier, 2000; Iqbal und Moellers, 2003). Von diesem Glucosinolat-Transporter wird vermutet, dass er z.B. die apoplastische Beladung der Siebelemente vornimmt und beim Transport irrtümlich entwichene Glucosinolate wieder zurück ins Phloem befördert (Chen et al., 2001).

Es ist nicht auszuschließen, dass die Glucosinolate im Phloem nicht nur dem Transport dienen, sondern auch eine Bedeutung bei der direkten Abwehr von Schadinsekten haben können, die die Leitbündel parasitieren, wie z. B. verschiedene Arten von Blattläusen.

Abschließend sei hervorgehoben, dass die Verlagerung von Glucosinolaten innerhalb der Pflanzen maßgeblich zur Flexibilität der Abwehrreaktionen beiträgt.

2.7 Die Evolution des Glucosinolat-Myrosinase-Systems

Zahllose Fakten legen nahe, dass sich der Metabolismus der Glucosinolate aus dem der cyanogenen Glucoside entwickelt hat, und dass die Myrosinasen von den im Pflanzenreich weit verbreiteten β -O-Glucosidasen abstammen (Rask et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Glucosinolaten sind die cyanogenen Glucoside im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet, sie kommen in Angiospermen, Gymnospermen und selbst Farnen vor (Seigler, 1991; Möller und Seigler, 1998). Kladistische Vergleiche der Gene für die große Untereinheit der Rubisco (rbcL) und der 18S ribosomalen RNA zeigten auf, dass die glucosinolathaltigen Pflanzen der nicht näher miteinander verwandten Ordnungen Capparales und Drypetes in Verwandtschaft zu den hochcyanogenen Pflanzen enthaltenen Familien Euphorbiaceae, Passifloraceae und Sapindaceae stehen (Rodman et al., 1996, 1998). In diesem Zusammenhang vermuten die Autoren, dass die Biosynthesewege der Glucosinolate aus dem der cyanogenen Glucoside entstanden sein könnten, und dass die biochemische Fähigkeit zur Cyanogenese eine Prädisposition für die Synthese der Glucosinolate darstellen könnte.

In den verschiedenen glucosinolathaltigen Pflanzen existieren mindestens drei unterschiedliche Wege zur Synthese der Aldoxime: über Cytochrom P450 Monooxygenasen (z.B. *Arabidopsis thaliana*; Halkier et al., 2002), über flavinhaltige Monooxygenasen (z.B. verschiedene *Brassica*-Spezies; Bennett et al., 1996) oder über Membran gebundene Peroxidasen (z.B. *Brassica campestris*; Ludwig-Müller et al., 1990). Den unterschiedlichen Biosynthesewegen der Glucosinolate als auch dem der cyanogenen Glucoside ist gemeinsam, dass nach der Oxidation von Aminosäuren als Zwischenprodukte die entsprechenden Aldoxime entstehen. Ab diesem Punkt verlaufen die Synthesewege der Glucosinolate und der der cyanogenen Glucoside jedoch grundsätzlich anders, weshalb lange Zeit vermutet wurde, dass eine Mutation in dem Gen des Enzyms zur Umwandlung der Aldoxime für die Entstehung Glucosinolate verantwortlich sein könnte (Bak et al., 1998a).

Für die cyanogenen Glucoside gilt es seit einem Jahrzehnt als gesichert, dass die Aldoxime über Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP71E1) der CYP-71-Familie zu α -Hydroxynitrilen umgesetzt werden (Bak et al., 1998b). Ein entsprechendes Enzym, dass in der Synthese der Glucosinolate die Umwandlung der Aldoxime zu den instabilen aci-nitro-Verbindungen oder Nitriloxiden katalysiert, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert. Interessanterweise gelang es über Sequenzhomologien zu CYP71E1 aus der

Mohrenhirse (*Sorghum bicolor*) ein Cytochrom P450-Enzym (CYP83B1) in *Arabidopsis* ausfindig zu machen, dass die Umwandlung der Aldoxime im Zuge der Biosynthese der Glucosinolate katalysiert (Hansen et al., 2001). Die anschließende Charakterisierung zeigte auf, dass CYP83B1 aus Aldoximen aci-nitro-Verbindungen oder Nitriloxide oxidiert (siehe Kapitel 2.1.3), die für die Pflanzen toxisch sind.

Für die in der Biosynthese der Glucosinolate stromabwärts auf CYP83B1 folgenden Enzyme wird angenommen, dass sie aus den Stoffwechselwegen zur Entgiftung dieser toxischen Verbindungen rekrutiert wurden. Zweifelsohne handelt es sich bei den Glutathion-S-Transferasen (vermutet), C-S-Lyasen, Glucosyltransferasen und Sulfotransferasen, um Enzyme pflanzlicher Entgiftungs-Mechanismen. Somit könnte die Präsenz der Glucosinolate in *Arabidopsis thaliana*, einer Pflanze der Ordnung Capparales, auf eine Mutation eines Proteins der CYP-71-Familie zurückzuführen sein.

An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei der Glucosinolat-Synthese in der Ordnung Drypetes um eine konvergente Entwicklung handelt, deren Entstehung bislang noch völlig ungeklärt ist (Rodman et al., 1996, 1998). Die Fähigkeit zur Bildung von Glucosinolaten ist somit im Verlauf der Evolution im Pflanzenreich mehrmals entstanden.

Die Myrosinasen zur Hydrolyse der Glucosinolate dürften in den glucosinolathaltigen Pflanzen der Ordnung Capparales von den älteren, im Pflanzenreich weit verbreiteten β -O-Glucosidasen zur Spaltung der cyanogenen Glucoside abstammen. Zum einen sind sich die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Myrosinasen und β -O-Glucosidasen sehr ähnlich. Obwohl die Sequenzen der Myrosinase aus *Sinapis alba* und der Linamarase aus *Trifolium repens* lediglich zu 46 % übereinstimmen, überlappen mehr als 90 % der C α -Atome in der Sekundärstruktur (Burmeister et al., 1997; Rask et al., 2000).

Des Weiteren sind sich auch die Exon/Intron-Verteilungsmuster der Gene der Myrosinasen und der β -O-Glucosidasen sehr ähnlich (Rask et al., 2000).

Der Hauptunterschied zwischen den beiden pflanzlichen Enzymen liegt darin, dass die katalytische Carboxylfunktion im aktiven Zentrum Glu187 der β -O-Glucosidasen aufgrund einer Mutation durch einen Glutaminrest ersetzt wurde (Burmeister et al., 1997). Dieser Rest ist in allen Myrosinasen hoch konserviert und kann auch als Unterscheidungsmerkmal zu den β -O-Glucosidasen herangezogen werden. Somit sind die Myrosinasen der Pflanzen aus der Ordnung Capparales ursprünglich vermutlich durch eine Punktmutation in der Sequenz einer β -O-Glucosidase entstanden.

Allerdings sind sowohl die Herkunft der Myrosinasen in den Pflanzen der Ordnung Drypetes bislang noch völlig unerforscht, als auch die Entstehung der zahlreichen Myrosinasen in den unterschiedlichen Insekten-, Pilz- oder auch Bakterienarten ungeklärt, so dass von einem polyphyletischen Ursprung der Myrosinasen ausgegangen werden muss.

2.8 Die Kapuzinerkresse - eine in vielerlei Hinsicht beachtenswerte Pflanze

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*)* gehört zu der neotropischen Familie der Tropaeolaceae, der insgesamt 88-90 einzelne Arten angehören (Decraene und Smets, 2001).

In den gezeigten Holzschnitten aus dem Jahr 1588 (Abbildung 12) werden die für die Kapuzinerkresse charakteristischen Erscheinungsformen der Blüten, Blätter und Früchte, sowie die des gesamten Kormus besonders gut deutlich.

Bei der Kapuzinerkresse handelt es sich um eine krautige Pflanze, die in ihrem Wuchs variabel ist. Die Variationsbreite reicht von Pflanzen mit einer Wuchshöhe von nur 0,3 m und kompakter Gestalt bis hin zu Pflanzen, die mehrere Meter lange kriechende oder kletternde Ranken ausbilden. Die Blätter sind wechselständig, sitzen an glatten relativ langen Stängeln und sind schildförmig, oftmals fast kreisrund oder aber auch schwach gelappt. Ihr Durchmesser variiert von 1-2 cm bis zu 15 cm.

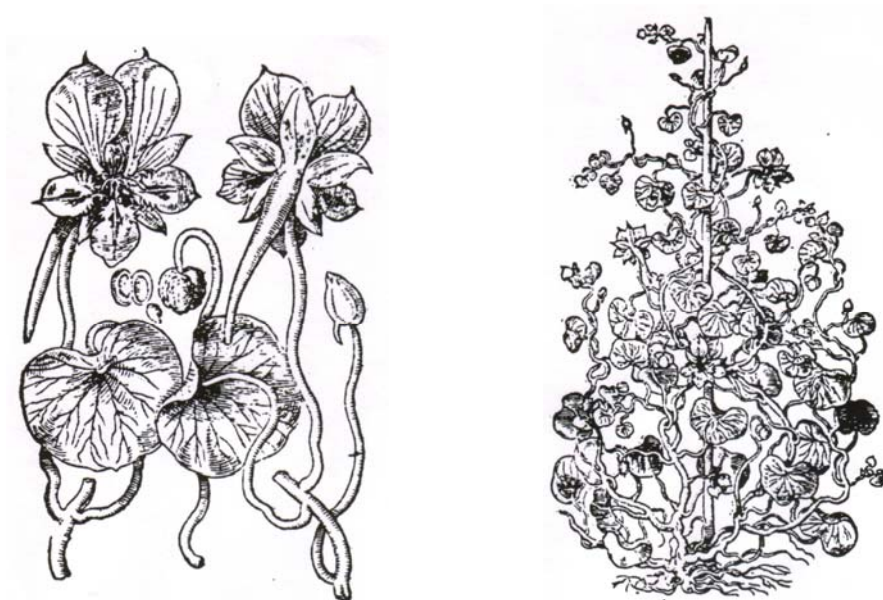


Abbildung 12: Holzschnitte der Kapuzinerkresse aus dem Jahr 1588

Hortus medicus et philosophicus von J. Camerius, Frankfurt am Main (Franz, 1996)

*Der Gattungsname „*Tropaeolum*“ leitet sich vom lateinischen Wort „*Tropaeum*“ ab, welches bei den Römern der Antike einen gestutzten mit Helmen, Schildern und Waffen behängten Baum bezeichnete, der als ein Siegeszeichen galt. Vermutlich erinnert der Kormus der Kapuzinerkresse entfernt an ein solches Siegeszeichen, die Blüten und Blätter könnten den Helmen und Schilden äquivalent sein (Franz, 1996). Der Namensteil Kapuziner der deutschen Bezeichnung lässt sich vermutlich aus der Ähnlichkeit von den Blüten und Blütenstern mit der Kopfbedeckung der Kapuzinermönche herleiten. Die Bezeichnung Kresse hingegen bezieht sich auf das lateinische Wort „*crescere*“, das wachsen bedeutet, womit vermutlich auf die hohe Wüchsigkeit dieser Pflanze hingewiesen wird (Cohnen und Lawniczak, 2005).

Die Blüten zeigen einen komplexen Aufbau und besitzen einen 2-3 cm langen Sporn in dem Nektar enthalten ist (Abbildung 12). Die Blütenfarben variieren ebenfalls stark, es treten Varietäten auf mit gelben, orangeroten, roten und manchmal auch fast braunen oder weißen Kronenblättern auf. Bei den Früchten handelt es sich um dreiteilige Spaltfrüchte.

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) wurde im späten 16. Jahrhundert aus der Neuen Welt in Europa eingeführt (Hänsel et al., 1994). Ihre ursprüngliche Heimat ist im tropischen Südamerika im Bereich der heutigen Länder Peru, Bolivien und Kolumbien zu finden. Entsprechend ihrer tropischen Herkunft ist sie sehr frostempfindlich und wächst in Mitteleuropa lediglich einjährig und muss daher kultiviert werden, kann aber auch in frostfreien Regionen des Mittelmeerraumes verwildern und ist dort wie in ihren Heimatländern ausdauernd.

Die Nutzung der Kapuzinerkresse durch den Menschen ist vielfältig. In Mitteleuropa ist vermutlich die Nutzung als Zierpflanze in Balkonkästen und Vorgärten am weitesten verbreitet. Des Weiteren wird die Kapuzinerkresse als milde Würz- und Speisepflanze genutzt. Die jungen, zarten, besonders scharf schmeckenden Blätter können sehr gut Frischkäsen und Quarkspeisen beigemischt werden. Die Blüten eignen sich sehr gut zur Dekoration von Speisen oder werden Salaten beigegeben. Die jungen Früchte in Essig eingelegt, sollen einen guten Kapernersatz liefern.

Für das menschliche Leben weitaus bedeutsamer erscheint hingegen der Einsatz der Kapuzinerkresse als Arzneipflanze:

In diesen Bereich fällt vor allem die Verwendung als pflanzliches Antibiotikum. Benzylisothiocyanat zeigt in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen bakteriostatische Wirkungen gegen zahlreiche Gram-positive und Gram-negative Bakterien, wie Pneumokokken, *Proteus mirabilis*, Staphylokokken, Tuberkelbakterien und Streptokokken (Hänsel et al., 1994; Stickl, 1955; Wechselberg, 1960). Diese antibakterielle Wirkung bildet die Basis für den Einsatz der Kapuzinerkresse zur Bekämpfung von Harnwegsinfektionen (siehe Kapitel 1.1).

Auch fungizide Wirkungen des Benzylsenföls gegen Hefestämme der Candida-Gruppe konnten nachgewiesen werden (Hänsel et al., 1994; Macura et al., 1980).

Im Tierversuch wurden ebenfalls antivirale Wirkungen des Benzylsenföls auf Hühnerpestviren (NewcastleVirus) an Küken nachgewiesen, die Mortalitätsrate konnte durch Gabe von galenischen Senfölextrakten auf ¼ der einer unbehandelten Vergleichsgruppe gesenkt werden (Scharpenseel et al., 1958).

Des Weiteren wurde eine immunstimulierende Wirkung des Benzylsenföls gezeigt, so wurde unspezifische Reizwirkung an Meerschweinchen beschrieben (Halbeisen, 1954).

In den letzten zwei Dekaden hat eine weitere Anwendung der Glucosinolate kontinuierlich an Bedeutung gewonnen:

Im Bereich der gesundheitlichen Prophylaxe wurde eine signifikante tumorinhibierende Wirkung des Benzylisothiocyanats auf verschiedene Tumorzell-Linien von Mensch und Tier nachgewiesen (Pintao et al., 1995). Diese antikanzerogene Aktivität scheint ein Grund dafür zu sein, dass die Tumorfrequenz bei Konsumenten der asiatischen Küche deutlich geringer ist (Hooper und Cassidy, 2006). Ähnliche Wirkungen wurden in dieser Arbeit bereits für das Sulforaphan, das Abbauprodukt des 4-Methylsulfinyl-Butyl-Glucosinolats in Brokkoli beschrieben (2.5.3).

3 Zielsetzungen dieser Arbeit

3.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es, unter Anwendung pflanzenbiologisch-biochemischer Strategien die medizinische Nutzung der Kapuzinerkresse zu verbessern. Im Fokus stehen neben der grundlegenden Entwicklung geeigneter Methoden zur Analyse der biochemischen Parameter des Glucosinolat-Myrosinase-Systems vor allem auch deren Anwendung mit dem Ziel, die Kapuzinerkresse hinsichtlich eines gesteigerten Wirkstoffgehaltes züchterisch zu bearbeiten.

3.1.1 Vorgehensweise

Der erste Schritt zur Verwirklichung einer biochemisch fundierten Optimierung der Nutzung der Kapuzinerkresse zu pharmazeutischen Zwecken ist die Entwicklung und Etablierung von Analysemethoden, die es zweifelsfrei ermöglichen, die in den Pflanzenmaterialien vorliegenden Glucosinolat-Gehalte, Myrosinase-Aktivitäten und Ascorbinsäure-Gehalte zu erfassen.

In Vorversuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die Glucosinolat-Gehalte einzelner Kapuzinerkressepflanzen stark variieren. Deshalb muss zunächst mit Hilfe von neu zu entwickelnden Methoden ein *screening* an einer möglichst hohen Zahl individueller Kapuzinerkressepflanzen verschiedener Sorten und Herkünfte erfolgen, um die Wahrscheinlichkeit Pflanzen mit einer besonders guten Eignung für die pharmazeutische Nutzung finden zu können zu erhöhen.

Als Selektionsparameter dieses *screenings* sollen nicht nur die biochemischen Parameter, wie Glucosinolat-Gehalte, Myrosinase-Aktivitäten und Ascorbinsäure-Gehalte herangezogen werden, sondern auch weitere für die spätere Nutzung relevante Faktoren, wie z.B. der Wuchs, sollen Beachtung finden.

Im Einzelnen sollten die potentiellen Kandidaten für die Nutzung als Medizinal-Kapuzinerkresse folgende erwünschte Eigenschaften aufweisen:

- Die Myrosinase-Aktivität in den Blättern sollte möglichst niedrig sein, um die Verluste an Glucosinolaten bei der Ernte und Trocknung zu minimieren. Dies lässt sich prinzipiell durch zwei Varianten erzielen:

Entweder ist die Myrosinase-Aktivität in den zu selektierenden Pflanzen generell sehr niedrig, oder aber die Myrosinase liegt in einem Zustand sehr geringer Aktivierung in den Blättern vor. Letzteres wäre der Fall, wenn die Ascorbinsäure-Konzentration im Blattmaterial weit unter der zu einer optimalen Aktivierung notwendigen Konzentration von 2 mM liegen würde. Aus diesem Grund sollen neben den Myrosinase-Aktivitäten auch immer die dazugehörigen Ascorbinsäure-Gehalte der einzelnen Pflanzen zur Selektion herangezogen werden.

- Der Glucosinolat-Gehalt in der Trockendroge sollte möglichst hoch sein. Da sich gezeigt hat, dass im Zuge einer Trocknung bei 40°C im Frischlufttrockenschrank die niedrigsten Verluste an Glucotropaeolin resultieren, werden sämtliche Trocknungen nach diesem Verfahren durchgeführt. Um die tatsächlichen Trocknungsverluste zu ermitteln, werden die Glucosinolat-Gehalte aber auch in den entsprechenden gefriergetrockneten Blattmaterialien bestimmt.
Anhand der ermittelten Daten sollen die Zusammenhänge zwischen dem Glucosinolat-Verlust bei der Trocknung, den ermittelten Myrosinase-Aktivitäten und dem Grad der Aktivierung der Myrosinase durch Ascorbinsäure aufgedeckt werden.
- Der Wuchs sollte von kompakter Form sein, um die Ernte der Blätter zu erleichtern und den Anteil an Stängeln mit niedrigeren Glucosinolat-Gehalten möglichst gering zu halten.

Nach der Realisierung dieses *screenings* wird es angestrebt, die Pflanzen, die sich als besonders viel versprechend erwiesen haben, zur Stammerhaltung und späteren Massenvermehrung in die *in vitro*-Kultur zu überführen.

Auch in den *in vitro*-Pflänzchen sollen nach der Vielfachsprossbildung die Glucosinolat-Gehalte bestimmt werden. Anhand der Pflanzen in der *in vitro*-Kultur soll exemplarisch heraus gearbeitet werden, in welchem Maße sich exogene Faktoren, wie z.B. der Sulfatgehalt im Medium auf die erzielbaren Glucosinolat-Gehalte auswirken

Aus den selektierten *in vitro*-Klonen sollen genetisch identische Kapuzinerkressepflanzen regeneriert werden, die nach einer Phase der Akklimatisierung auf einem Versuchsfeld der Forschungsanstalt für Landwirtschaft ausgebracht werden. Von diesen regenerierten Pflanzen müssen die Parameter des Glucosinolat-Myrosinase-Systems erneut ermittelt werden. So können Vergleiche zu den Mutterpflanzen gezogen werden, um eine abschließende Beurteilung der Eignung zur pharmazeutischen Nutzung der selektierten Klone zu ermöglichen.

3.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den physiologisch, grundlagenwissenschaftlichen Kenntnisstand in Bezug auf den Langstreckentransport der Glucosinolate zu erweitern. Zu diesem Zweck soll an der Kapuzinerkresse als Modellsystem die aufgestellte Hypothese überprüft werden, dass die Glucosinolate in Analogie zu den cyanogenen Glucosiden ebenfalls als Diglucoside über das Phloem verlagert werden.

3.2.1 Vorgehensweise

Zunächst muss verifiziert werden, ob und in welcher Weise vergleichbare Randbedingungen für die Verlagerung von Glucosinolaten wie beim Transport von cyanogenen Glucosiden

vorliegen, das heißt, das Vorhandensein apoplastischer Glucosidasen schließt das Vorkommen intakter Glucoside im Apoplasten aus.

Anhand von Infiltrationsversuchen mit Blättern der Kapuzinerkresse soll überprüft werden, ob Myrosinase apoplastisch vorkommt, die das Vorhandensein von entsprechenden Glucosinolat-Transportformen zwingend erforderlich machen würde.

Im Falle eines positiven Ergebnisses sollen aus apoplastischen Guttationsflüssigkeiten und Nektar der Kapuzinerkresse geeignete Extrakte erstellt werden um mittels der HPLC/MS-Technologie die Existenz von entsprechenden Substanzen nachzuweisen. In diesem Zusammenhang kommt dem Nachweis eines Glucotropaeolin-Glucosids eine besondere Bedeutung zu.

Mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie sollen die den isolierten Substanzpeaks zugrunde liegenden chemischen Strukturen eindeutig aufgeklärt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte

Hohe Variabilität im Erscheinungsbild der Kapuzinerkressepflanzen

Schon im Vorfeld des Projektes zeigte sich in ersten Anbauversuchen von Kapuzinerkresse-Saatgutmischungen, dass sich die einzelnen Kapuzinerkressepflanzen ganz erheblich in ihren Phänotypen unterscheiden, obwohl sie alle einer einzigen Art angehören (Abbildung 13).

Aus dieser Beobachtung heraus entwickelte sich die diesem Projekt zugrunde liegende Hypothese, dass, wenn sich die einzelnen Pflanzen einer Art dermaßen stark in ihren Phänotypen unterscheiden, sie sich dann vermutlich auch ähnlich stark in Hinblick auf die biochemischen Charakteristika des Glucosinolat-Myrosinase-Systems unterscheiden müssten.



Abbildung 13: Einzelne Kapuzinerkressepflanzen (*Tropaeolum majus*) zeigen eine hohe Variabilität in ihren Phänotypen: Die Vermutung liegt nahe, dass sich die Pflanzen hinsichtlich ihrer biochemischen Charakteristika ähnlich stark unterscheiden.

In diesem Fall sollte es möglich sein einzelne Pflanzen zu selektionieren, die sich aufgrund ihrer spezifischen biochemischen Charakteristika besonders gut für die pharmazeutische Nutzung eignen. Diese Pflanzen sollen in die *in vitro*-Kultur überführt werden und unter Bewahrung ihrer biochemischen Eigenschaften weiter vermehrt werden.

In diesem Kapitel werden zunächst die im Zuge des *Tropaeolum*-Projektes gewonnenen Ergebnisse vorgestellt und anschließend diskutiert. Hierbei spiegelt die Reihenfolge der Kapitel auch weitestgehend die durchgeführten wissenschaftlichen Arbeiten in chronologischer Reihenfolge wider und berücksichtigt auch die kausale Kontinuität des gesamten Arbeitsprozesses. Anschließend erfolgt eine abschließende Bewertung und Einordnung der gewonnenen Ergebnisse, die die gewählte Strategie zur Zucht kritisch

betrachtet und die Relevanz für die zukünftige pharmazeutische Nutzung der Kapuzinerkresse aufzeigt.

4.1.1 Screening: Ascorbinsäure-Gehalte - Aktivierungsstatus der Myrosinase

Als erster Parameter des Glucosinolat-Myrosinase-Systems wurden die Ascorbinsäure-Gehalte in den Blättern der Kapuzinerkresse untersucht. Wie im Kapitel 2.2.3 aufgezeigt, hat die Ascorbinsäure-Konzentration einen enorm starken Einfluss auf die Höhe der *in vitro* messbaren Myrosinase-Aktivität. Für die untersuchte Myrosinase stellt die Ascorbinsäure einen äußerst effektiven Aktivator dar und ist für deren Aktivität sogar eine essentielle Voraussetzung. Dies hat natürlich Konsequenzen für das *screening*, und es wurde gefolgert, dass es für die pharmazeutische Nutzung von großem Vorteil sei, Pflanzen zu selektieren, deren Ascorbinsäure-Konzentration im Zellsaft der Blätter unterhalb der ermittelten Konzentration von 2 mM zur optimalen Aktivierung der Myrosinase liegen sollten.

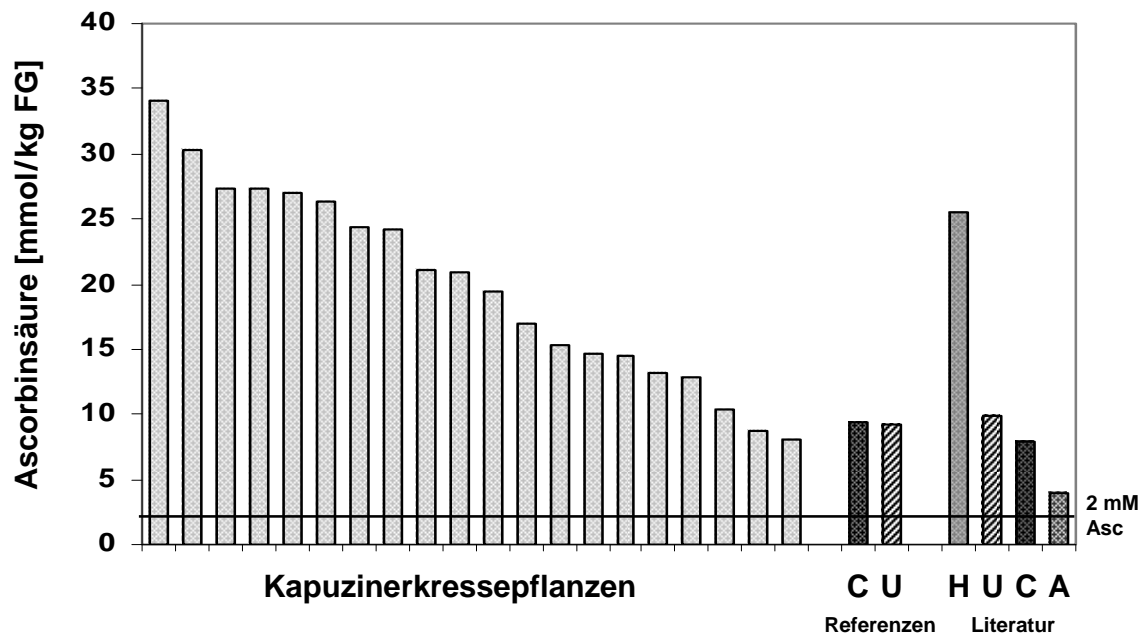


Abbildung 14: Ascorbinsäure-Gehalte in den Blättern der Kapuzinerkresse

Die Ascorbinsäure-Gehalte in den Blättern von *Tropaeolum majus* liegen wesentlich höher als die Ascorbinsäure-Konzentration von 2 mM zur maximalen Aktivierung der Myrosinase. Zum Vergleich wurden auch die Ascorbinsäure-Gehalte von *Capsicum annuum* (C) und *Urtica dioica* (U) bestimmt, sowie publizierte Ascorbinsäure-Gehalte von *Capsicum annuum*, *Urtica dioica*, *Hippophae rhamnoides* (H), *Citrus limon* (C) und *Actinidae deliciosa* (A) aufgetragen (Bayer. Landesanstalt für Ernährung, 2001). (Mittlere Standardabweichung: 1,33 %)

Um zu analysieren, wie hoch die Ascorbinsäure-Gehalte in den Blättern der Kapuzinerkresse tatsächlich liegen, wurden von über 25 im Freiland angebauten Pflanzen jeweils 10 Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff Blatthomogenate erstellt und die Ascorbinsäure-Gehalte in dem Blattmaterial ermittelt.

Die Ascorbinsäure-Gehalte der einzelnen Kapuzinerkressepflanzen variierten etwa um den Faktor vier und liegen zwischen rund 8 und fast 35 mmol/kg Frischgewicht (Abbildung 14). Somit lagen in allen Pflanzen die ermittelten Ascorbinsäure-Gehalte weit über der Konzentration von 2 mM, die zur maximalen Aktivierung der Myrosinase erforderlich ist. Dies bedeutet, dass es keine Kapuzinerkressepflanzen gibt, die eine so niedrige Ascorbinsäure-Konzentration im Zellsaft aufweisen, die nicht zur optimalen Aktivierung der Myrosinase ausreicht.

Aufgabe des Selektionsparameters Ascorbinsäure-Gehalt

Für den weiteren Verlauf des *screenings* bedeuten diese Ergebnisse, dass der Parameter Ascorbinsäure-Gehalt nicht mehr berücksichtigt werden muss, da es praktisch ausgeschlossen werden kann, dass es Kapuzinerkressepflanzen gibt, deren Ascorbinsäure-Gehalte so niedrig sind, dass die Myrosinasen nicht vollständig aktiviert werden. Somit erscheint es als wenig aussichtsreich durch gezielte Selektion ascorbinsäurearmer Pflanzen die Glucosinolat-Verluste während der Ernte und Trocknung zu minimieren.

Ein Vergleich mit den Ascorbinsäure-Gehalten anderer Pflanzen, wie z. B. Sanddorn (*Hippophae rhamnoides*), Zitrone (*Citrus limon*) oder Kiwi (*Actinidae deliciosa*), die wegen ihres hohen Vitamin C-Gehalts als besonders wertvoll für die menschliche Ernährung gelten, macht deutlich, dass die Kapuzinerkresse mit einem mittleren Gehalt von ca. 20 mmol/kg Frischgewicht ähnlich hohe Ascorbinsäure-Gehalte wie Sanddorn aufweist und somit durchaus auch eine ausgezeichnete Vitamin C-Quelle darstellt (Abbildung 14).

Die Ascorbinsäure erfüllt in den Pflanzen neben ihrer Rolle als Cofaktor der Myrosinasen und einiger anderer Hydroxylasen (z. B. Prolylhydroxylase und Lysylhydroxylase) noch eine ganze Reihe weiterer Funktionen (Smirnoff, 1996; Smirnoff und Wheeler, 2000).

Ganz besonders wichtig für das Leben der Pflanzen ist ihre Wirkung als Antioxidationsmittel. Im Ascorbat-Glutathion-Zyklus nimmt die Ascorbinsäure eine Schlüsselrolle im Schutz gegen (photo)-oxidativen Stress ein. So können reaktive Sauerstoffspezies (Superoxid, Ozon etc.) abgefangen werden, die als Beiprodukte des photosynthetischen/aeroben Stoffwechsels freigesetzt werden (Smirnoff, 1996; Smirnoff und Wheeler, 2000).

Des Weiteren kann die Ascorbinsäure auch als Elektronentransporter in der Photosynthese und Atmung dienen und geht als Vorstufe in die Synthese von Oxalaten und Tartraten ein (Smirnoff, 1996; Smirnoff und Wheeler, 2000).

4.1.2 Screening: Myrosinase-Aktivitäten

Als zweiter Parameter des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in *Tropaeolum* wurde die Myrosinase-Aktivität in den Blättern der Pflanzen untersucht.

Kapuzinerkressepflanzen mit verhältnismäßig niedriger Myrosinase-Aktivität in den Blättern sollten folgerichtig während der Ernte und anschließenden Trocknung auch geringere Verluste an Glucosinolaten aufweisen als Pflanzen mit relativ hohen Myrosinase-Aktivitäten. Dieser Hypothese entsprechend müsste es für die geplante pharmazeutische Nutzung von Vorteil sein, Sorten anzubauen, die dahingehend züchterisch optimiert wurden, dass sie zum einen hohe Glucosinolat-Gehalte in den Blättern aufweisen (siehe Kapitel 4.1.3.3) und zum anderen diese auch während der Ernte und anschließenden Trocknung bestmöglich bewahren, da die Degradation aufgrund der niedrigen Myrosinase-Aktivitäten unterbunden wird.

Diesen Zielsetzungen entsprechend wurden von 60 Kapuzinerkressepflanzen aus dem Freilandanbau jeweils 15 Blätter geerntet und Enzymrohextrakte für die Bestimmung der Myrosinase-Aktivitäten hergestellt.

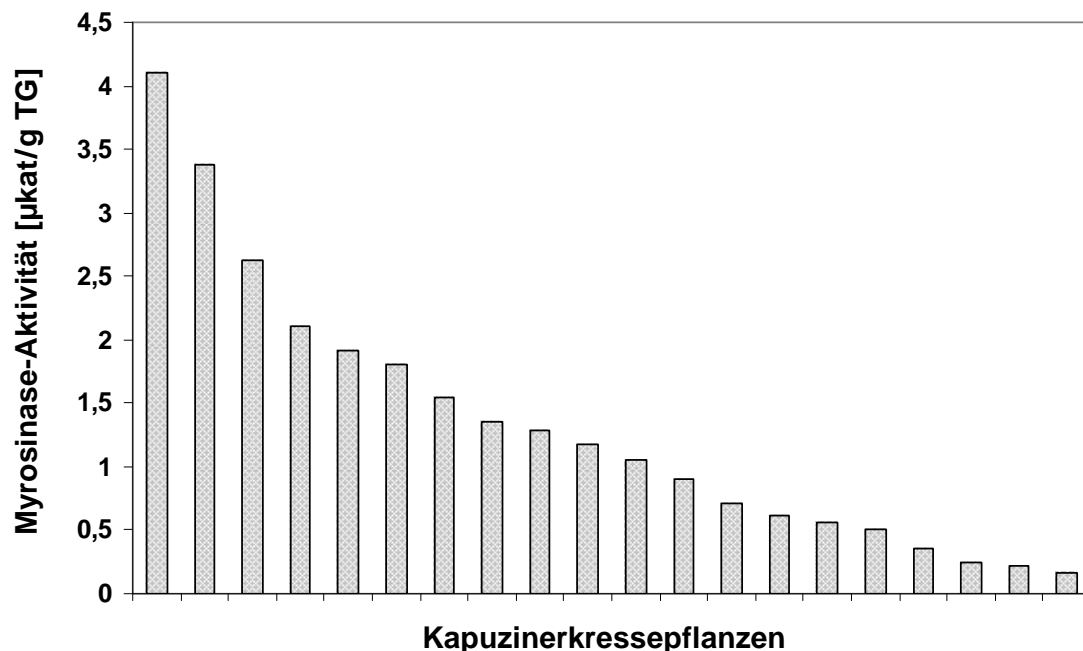


Abbildung 15: Variationsbreite der Myrosinase-Aktivität einzelner Kapuzinerkressepflanzen

Die untersuchten Pflanzen wurden im Freiland kultiviert. Die individuelle Myrosinase-Aktivität variiert um den Faktor 25, die mittlere Aktivität liegt bei ca. 1,33 µkat/g TG. (Mittlere Standardabweichung: 10,32 %)

Das Blockdiagramm macht deutlich, dass die einzelnen *Tropaeolum*-Pflanzen sehr unterschiedlich hohe Myrosinase-Aktivitäten in ihren Blättern aufweisen (Abbildung 15). Sie schwankt etwa um den Faktor 25 von 0,17 µkat/g TG bis 4,1 µkat/g TG. Die mittlere Myrosinase-Aktivität wurde mit rund 1,33 µkat/g TG bestimmt.

Für das *screening* bedeuten diese Ergebnisse, dass tatsächlich möglich sein müsste, Kapuzinerkressepflanzen mit besonders niedrigen Myrosinase-Aktivitäten zu selektionieren.

Allerdings ist es für die geplante Selektion notwendig, ebenfalls die Glucosinolat-Gehalte vor und nach der Trocknung, sowie die individuellen Trocknungsverluste an Glucotropaeolin mit einzubeziehen (siehe Kapitel 4.1.3.3).

Bislang sind in der Literatur für Myrosinase-Aktivitäten keine vergleichbaren Studien verfügbar. Allerdings sind entsprechende Daten für pflanzliche β -Glucosidasen publiziert. So weist die β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* ebenfalls sehr starke individuelle Aktivitätsschwankungen auf. Hier variiert die Aktivität des Enzyms von Pflanze zu Pflanze um den Faktor 80 (Lieberei, 1988). Somit liegt die für *Tropaeolum* ermittelte Variationsbreite in einer vergleichbaren Größenordnung.

Ein Vergleich der ermittelten Werte mit den gemessenen Aktivitäten der Myrosinasen anderer Pflanzen ist problematisch, da meist keine vergleichbaren Inkubations-Bedingungen herrschten. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Aktivierbarkeit durch Ascorbinsäure bei den einzelnen Myrosinasen sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. Ein weiterer Aspekt erschwert den Vergleich: Nur in wenigen Fällen ist als Bezugsgröße das Trockengewicht gewählt worden, meist sind die ermittelten Myrosinase-Aktivitäten auf den Proteingehalt bezogen, da dies für die Ermittlung der Reinigungsfaktor erforderlich ist.

4.1.3 Screening: Glucotropaeolin-Gehalte

Die Glucotropaeolin-Gehalte stellen im *screening* den wichtigsten Parameter zur Pflanzenselektion dar, so hängen vom erzielbaren Glucotropaeolin-Gehalt in der Trockendroge ganz maßgeblich die Mengen an freisetzbaren Senfölen und damit auch letztendlich die Wirksamkeit des zu entwickelnden Antibiotikums ab.

In diesem Zusammenhang ist zu berücksichtigen, dass die Gehalte der meisten pflanzlichen Sekundärstoffe keine feste Größe darstellen, sondern - neben den organspezifischen Variationen - vor allem vom Entwicklungszustand der Pflanzen abhängen.

In diesem Kapitel werden zunächst die für das *screening* relevanten entwicklungsspezifischen und individuellen Unterschiede im Glucosinolat-Gehalt aufgezeigt und die Konsequenzen dieser Ergebnisse für die Probennahmen abgeleitet. Als zweites werden die Variationsbreiten der Glucosinolat-Gehalte gefriergetrockneter und im Trockenschrank getrockneter Blätter präsentiert, um Korrelationen der ermittelten Trocknungsverluste an Glucotropaeolin mit den gemessenen *in vitro*-Myrosinase-Aktivitäten aufzuzeigen.

4.1.3.1 Altersspezifische Gehalts-Unterschiede

Für die Probennahmen des *screenings* ist es wichtig im Vorfeld zu klären, ob und wie stark sich die Glucotropaeolin-Gehalte einzelner Blätter einer Pflanze unterscheiden und ob es entwicklungsabhängige Verteilungsmuster des Glucosinolat-Gehaltes gibt. Dies ermöglicht die Ernte von vergleichbarem Pflanzenmaterial.

Wie bereits von anderen glucosinolathaltigen Pflanzen bekannt ist, wird die Höhe des Glucosinolat-Gehaltes in den Blättern stark vom Alter der Blätter beeinflusst, häufig weisen die jungen Blätter einer Pflanze höhere Gehalte auf als die alten (siehe 2.1.4).

Um zu klären, ob und inwieweit in der Kapuzinerkresse ähnliche altersspezifische Verteilungsmuster des Glucotropaeolin-Gehaltes in den Blättern bestehen, wurden von den Pflanzen ganze Ranken abgetrennt, die einzelnen Blätter der Reihe nach von der Triebspitze zur Basis hin geerntet (Abbildung 16), in Stickstoff schockgefroren, homogenisiert und die Glucotropaeolin-Gehalte ermittelt.

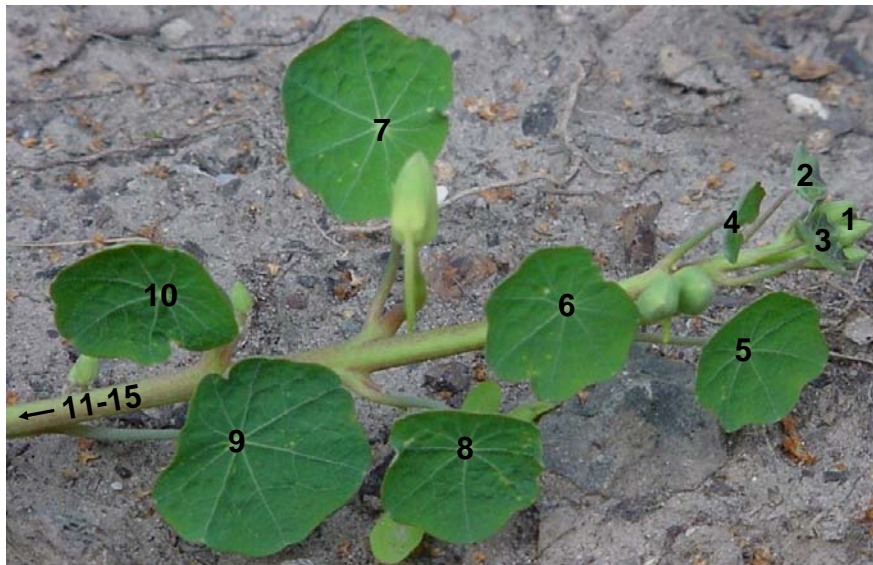


Abbildung 16: Ranke von *Tropaeolum majus*

Den eingefügten Zahlen der Blätter und der Triebspitze entsprechen die Balken des nachfolgenden Blockdiagramms (Abbildung 17, Seite 52).

Die Analysen zeigten, dass die Höhe des Glucosinolat-Gehaltes stark vom Alter des untersuchten Blattes abhängig ist (Abbildung 17, Seite 52). In den Blättern der Triebspitze ist der Glucotropaeolin-Gehalt mit über 120 $\mu\text{mol/g}$ TG fast dreimal so hoch wie in den basalen Blättern, für die ein mittlerer Glucotropaeolin-Gehalt von rund 45 $\mu\text{mol/g}$ TG bestimmt wurde.

Entsprechend der allgemeinen Sichtweise der relevanten Literatur unterstreichen diese Ergebnisse die Annahme, dass das Glucotropaeolin bzw. die daraus freigesetzten Senföle, eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr spielen (Chew, 1988; Glen et al., 1990; Buskov et al., 2002; Noret et al., 2005; Ulmer et al., 2001; Tierens et al., 2001; Mari et al., 2002). Gemäß der Grundsätze der chemischen Ökologie bedürfen insbesondere die sensiblen und für das Leben der Pflanzen sehr wichtigen Wachstumszonen, wie die Triebspitzen, eines hohen Grades an Schutz gegenüber Pathogenen und Fraßfeinden. Ob und

inwieweit die Glucosinolate in den Blättern der Triebspitzen synthetisiert werden oder ob sie aus den älteren Blättern dorthin transportiert werden, ist zurzeit noch nicht geklärt.

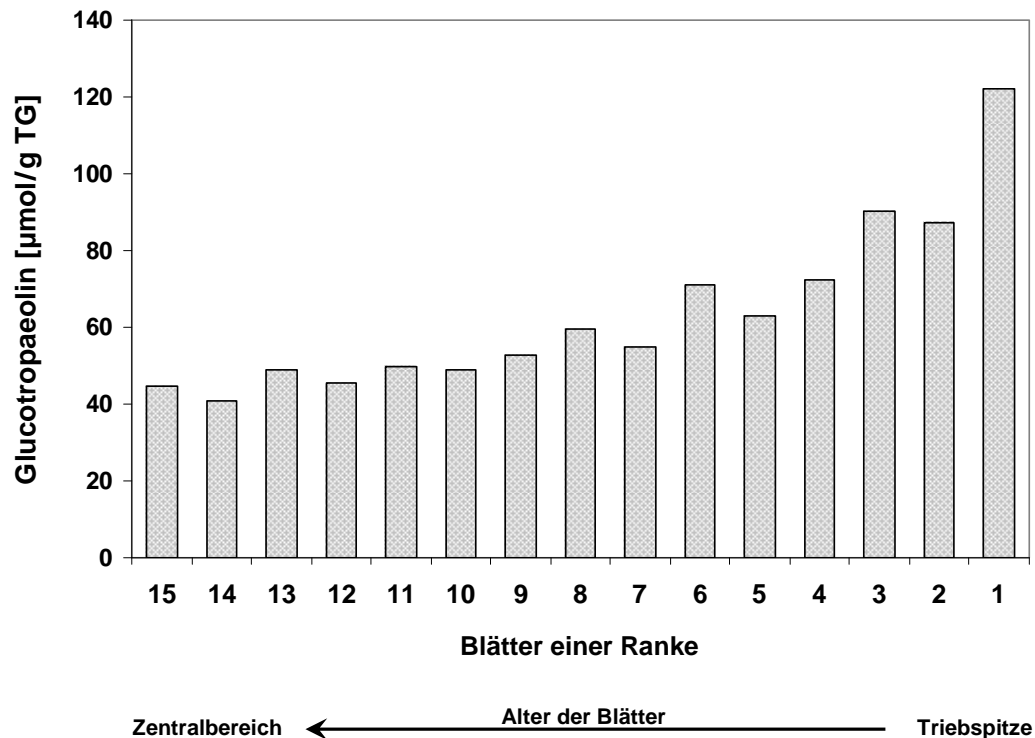


Abbildung 17: Glucosinolat-Gehalte in den Blättern einer Ranke von *Tropaeolum majus*
(Mittlere Standardabweichung: 1,39 %)

Für das angestrebte *screening* bedeuten diese Ergebnisse, dass für die Bestimmung der mittleren Glucosinolat-Gehalte einzelner Pflanzen nach Möglichkeit von allen Pflanzen Blätter einer vergleichbaren Altersstufe geerntet, bzw. Blätter definierter Altersstufen untersucht werden sollten.

Somit scheint es für das *screening* am zweckmäßigsten zu sein, lediglich alte, ausgewachsene Blätter für die Analysen zu verwenden, da diese innerhalb der Ranken die geringsten Unterschiede im Glucosinolat-Gehalt aufweisen, die Mehrheit der Blätter einer Pflanze ausmachen und der höchste Grad an Homogenität der Einzelproben erzielt werden kann.

4.1.3.2 Gehalte in voll entwickelten Blättern

In einer Versuchsreihe wurde untersucht, in welchem Maße die Glucosinolat-Gehalte in den ausgewachsenen Blättern in Bezug auf die gesamte Pflanze variieren.

Zu diesem Zweck wurden jeweils 10-15 ausgewachsene, fast gleich alte Blätter einzelner Pflanzen geerntet. Um dies zu gewährleisten, wurde gezielt auf verschiedene Ranken

zurückgegriffen. Die abgepflückten Blätter wurden in Stickstoff schockgefroren und mit Mörser und Pistill homogenisiert. Die Glucosinolat-Gehalte wurden mit Hilfe der HPLC bestimmt.

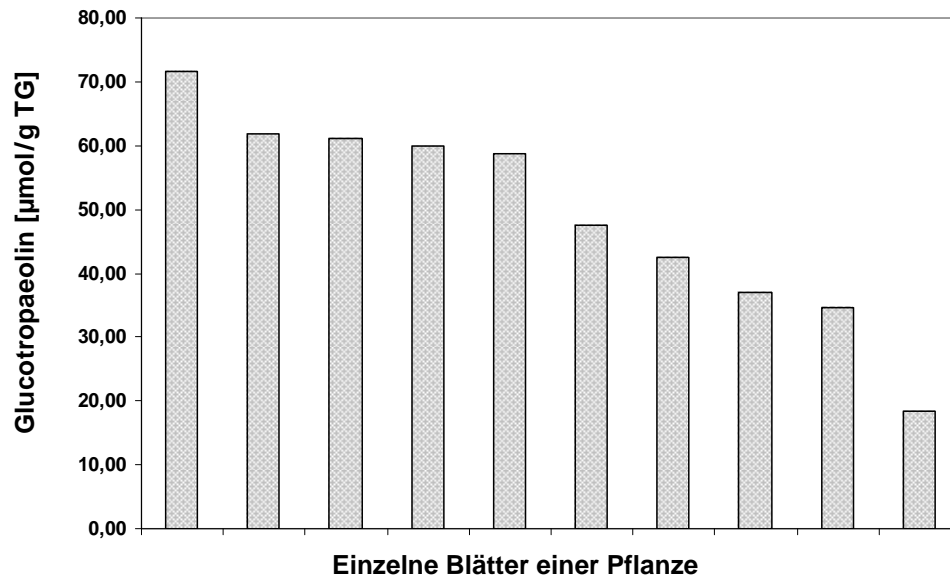


Abbildung 18: Glucotropaeolin-Gehalte in ausgewachsenen Blättern einer Pflanze
(Standardabweichung: 9,89 %)

Es zeigt sich, dass die Glucosinolat-Gehalte der ausgewachsenen nahezu gleich alten Blätter verschiedener Ranken ausgesprochen stark variieren. So schwankt der Glucotropaeolin-Gehalt in den einzelnen Blättern der in Abbildung 18 gezeigten Pflanze zwischen 18,4 und 71,6 µmol/g TG und variiert somit fast um den Faktor 4. Die Schwankungsbreite der Glucosinolat-Gehalte zwischen den ausgewachsenen Blättern verschiedener Ranken einer Pflanze fällt somit größer aus als die altersspezifischen Unterschiede im Glucosinolat-Gehalt innerhalb der einzelnen Ranken (Schwankungsbreite um den Faktor 3).

Diese großen individuellen Unterschiede im Glucosinolat-Gehalt der einzelnen Blätter machen es notwendig für das *screening* möglichst viele Blätter einer Pflanze für jede einzelne Gehaltsbestimmung zuernten. Aus diesem Grund wurden jeweils die relativ hohe Anzahl von 15 ausgewachsenen Blättern pro Pflanze für eine einzelne Bestimmung des Glucosinolat-Gehaltes eingesetzt, um den mittleren Glucosinolat-Gehalt der Pflanzen möglichst zuverlässig bestimmen zu können.

4.1.3.3 Glucosinolat-Gehalte der Einzelpflanzen

In den Vegetationsperioden der Jahre 2003-2005 wurden im Zuge des *screenings* rund 200 Kapuzinerkressepflanzen auf ihre Glucosinolat-Gehalte hin untersucht.

Von den einzelnen Pflanzen wurden jeweils 30 Blätter geerntet. Hiervon wurden 15 Blätter direkt auf dem Versuchsfeld in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss

gefriergetrocknet, wohingegen die verbleibenden Blätter im Frischlufttrockenschrank bei 40°C getrocknet wurden. Von den erstellten Trockenmaterialien wurden im Anschluss die Glucosinolat-Gehalte bestimmt. Diese Vorgehensweise ermöglicht es zum einen den tatsächlichen Glucosinolat-Gehalt (ohne Trocknungsverluste) und den Gehalt an Glucosinolaten in der Trockendroge nach der Trocknung im Frischlufttrockenschrank bei 40°C zu bestimmen. Aus diesen Daten wurde für jede einzelne Pflanze der individuelle Trocknungsverlust an Glucotropaeolin ermittelt.

Für die Auswahl von Kapuzinerkresse-Varietäten zur pharmazeutischen Nutzung stellten die Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge das Hauptkriterium zur Selektion und Überführung in die *in vitro*-Kultur dar. Repräsentativ für die in den Jahren 2003-2005 durchgeführten Analysen der Glucosinolat-Gehalte werden die Daten von 20 Pflanzen, die der Versuchsfläche des Botanischen Gartens entstammen, gezeigt (Abbildungen 19.1 und 19.2), die mittleren Gehalte der einzelnen Erntechargen werden in Tabelle 2 präsentiert (Seite 59).

4.1.3.3.1 Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge (gefriergetrocknet)

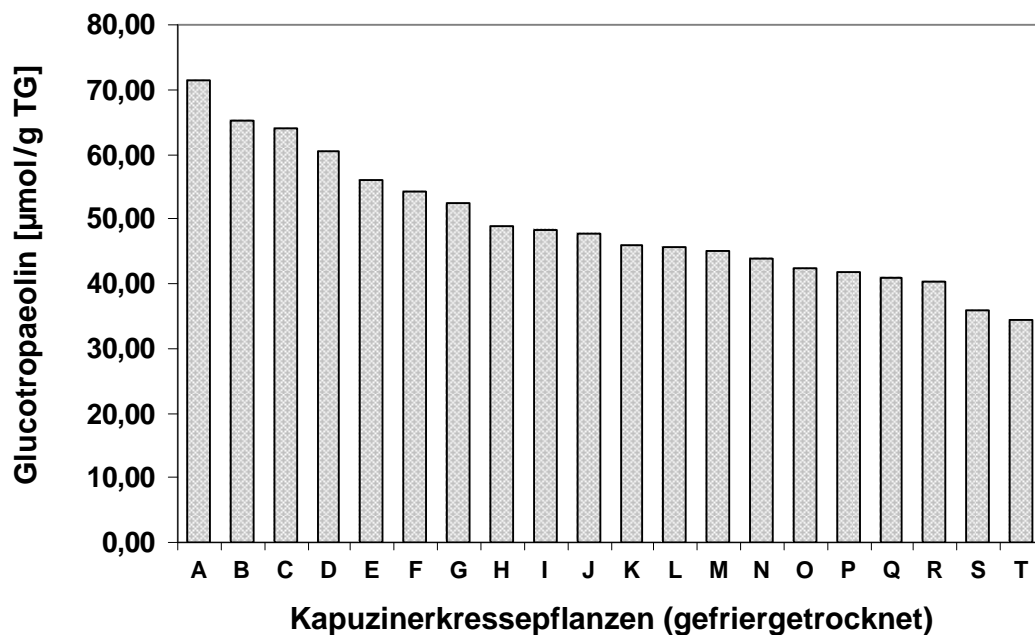


Abbildung 19.1: Tatsächliche Glucosinolat-Gehalte in den Blättern der Kapuzinerkressepflanzen des screenings (08.09.2005)
Botanischer Garten, Braunschweig
(Mittlerer GTL-Gehalt: 49,24 µmol/g TG; Standardabweichung: 4,01 %)

Wie erwartet zeigen sich ausgeprägte individuelle Unterschiede der Glucosinolat-Gehalte in den Blättern einzelner Kapuzinerkressepflanzen (Abbildung 19.1). Aufgrund der methodischen Vorgehensweise zur Probennahme (direktes gefrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließender Gefriertrocknung) entsprechen die Glucosinolat-Gehalte weitestgehend den tatsächlich in den Pflanzen vorfindbaren Wirkstoffgehalten.

In den untersuchten Pflanzen variierten die Glucotropaeolin-Gehalte von etwa 33 $\mu\text{mol/g}$ TG bei der Pflanze mit dem niedrigsten Glucosinolat-Gehalt bis zu über 70 $\mu\text{mol/g}$ TG in den wirkstoffreichsten Pflanzen. Die Höhe der Glucosinolat-Gehalte der Einzelpflanzen schwankte somit etwa um den Faktor 2. Der mittlere Glucosinolat-Gehalt wurde mit 49,24 $\mu\text{mol/g}$ TG ermittelt.

Im Verhältnis zu den sehr hohen Schwankungsbreiten der Gehalte in einzelnen Blättern bzw. in den einzelnen Blättern der Ranken einer Pflanze fällt die Schwankungsbreite unterschiedlicher Pflanzen sehr gering aus. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Glucosinolat-Gehalte in den Pflanzen stärker von entwicklungs- und organspezifischen Regulationsmechanismen bestimmt werden, als dass sie einer genetischen Determinierung unterliegen. Zudem belegen diese Ergebnisse den hohen Grad an Flexibilität in der systemischen Abwehr, den die Pflanzen durch die Möglichkeit der unterschiedlichen entwicklungs- und organspezifischen Verteilung an Glucosinolaten erlangen.

4.1.3.3.2 Glucosinolat -Gehalte in der Trockendroge (Ofen getrocknet)

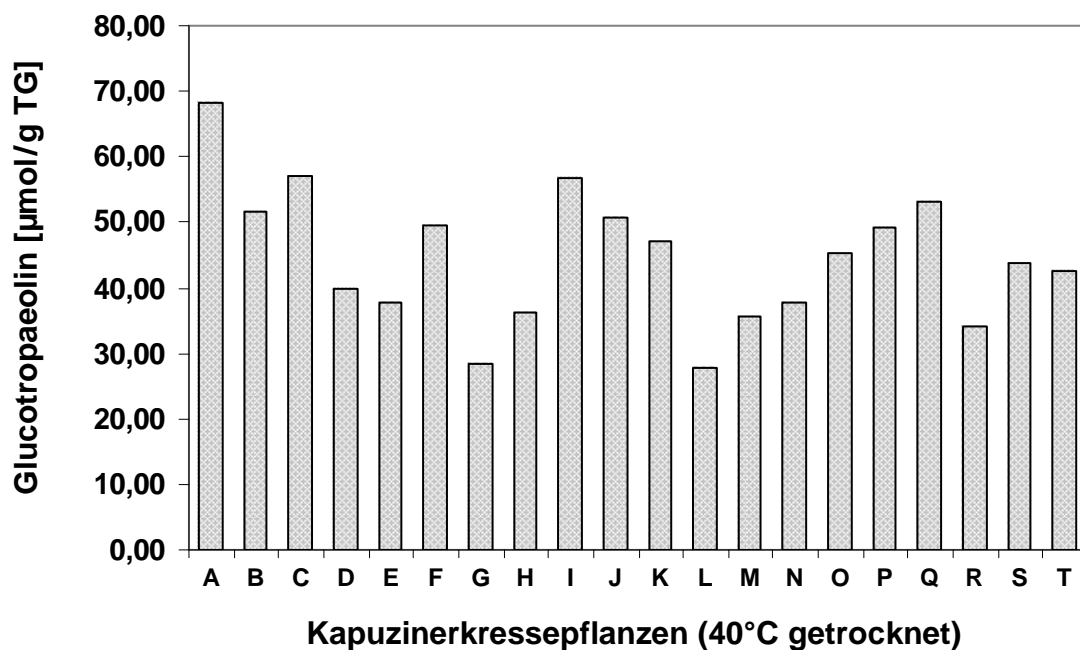


Abbildung 19.2: Glucosinolat-Gehalte in den Blättern derselben Pflanzen nach Trocknung im Trockenschrank

(Mittlerer GTL-Gehalt: 44,61 $\mu\text{mol/g}$ TG; Standardabweichung: 1,40 %)

Die Glucosinolat-Gehalte in den Blättern derselben Pflanzen nach Trocknung im Frischlufttrockenschrank (40°C) schwankten ähnlich stark wie nach der Gefriertrocknung (Abbildung 19.2) Die erstellte Trockendroge der Pflanze mit dem niedrigsten Glucosinolat-Gehalt enthielt lediglich 28 $\mu\text{mol/g}$ TG Glucotropaeolin, wohingegen die Pflanze mit dem höchsten Glucosinolat-Gehalt rund 68 $\mu\text{mol/g}$ TG Glucotropaeolin in der Trockendroge

enthielt. Die Glucosinolat-Gehalte in den von den einzelnen Pflanzen gewonnenen Trockenmaterialien schwankten somit rund um das 2,5fache. Der mittlere Glucosinolat-Gehalt des im Ofen getrockneten Blattmaterials wurde mit 44,61 $\mu\text{mol/g TG}$ ermittelt. Damit lagen die Wirkstoffgehalte in der durch Frischlufttrocknung gewonnenen Trockendroge lediglich um etwa 5 % niedriger als die tatsächlichen Glucosinolat-Gehalte im Blattmaterial. Diese Daten unterstreichen die sehr gute Eignung der Frischlufttrocknung bei 40°C für die Gewinnung wirkstoffreichen Blatttrockenmaterials zur pharmazeutischen Nutzung.

Für die pharmazeutische Nutzung der Kapuzinerkresse ist die geplante Vorgehensweise, lediglich Pflanzen mit besonders hohen Wirkstoffgehalten in der Trockendroge auszuwählen und unter Bewahrung ihrer sortentypischen Eigenschaften (hoher Wirkstoffgehalt in der Trockendroge) in die *in vitro*-Kultur zu überführen. Zur Erfassung der Pflanzenphysiologischen Grundlagen der unterschiedlichen Trocknungsverluste ist allerdings eine Gegenüberstellung der Gehalte von frischen und von getrockneten Blättern im Vergleich zur Myrosinase-Aktivität unerlässlich.

4.1.3.3 Individuelle Trocknungsverluste an Glucotropaeolin

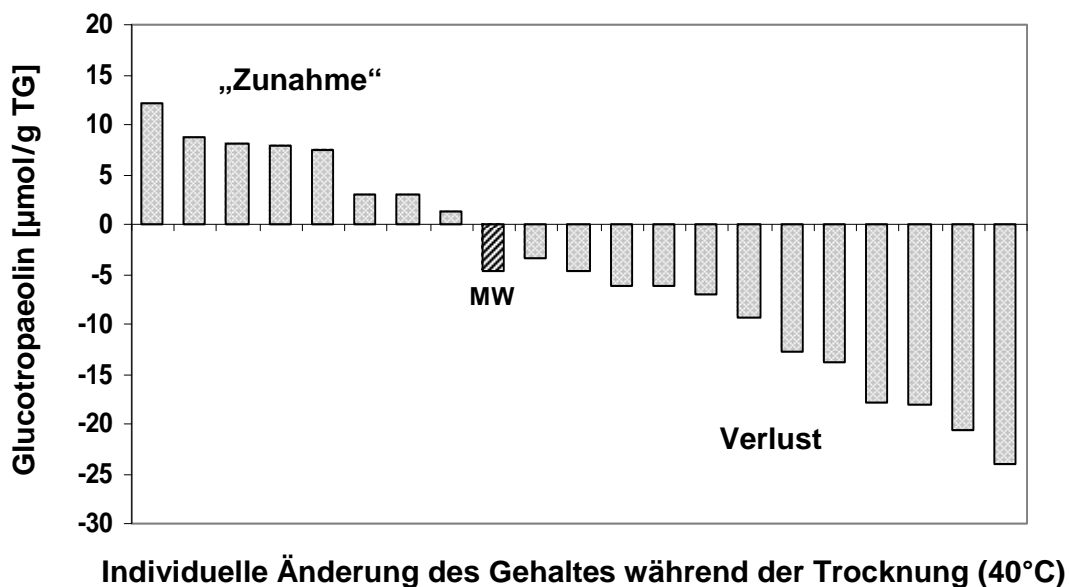


Abbildung 19.3: Individuelle Änderung des Glucotropaeolin-Gehaltes während der Trocknung (Frischlufttrockenschrank 40°C)

(Mittlerer Trocknungsverlust: MW=4,63 $\mu\text{mol/g TG}$)

Ermittelt aus den Daten zum Glucotropaeolin-Gehalt der Graphen 19.1 und 19.2

Die Bestimmung der individuellen Trocknungsverluste an Glucotropaeolin ergab, dass die Blätter der einzelnen Kapuzinerkressenpflanzen auch individuell sehr unterschiedlich hohe Verluste an Glucotropaeolin im Zuge der Frischlufttrocknung erfahren (Abbildung 19.3).

So nimmt der Glucosinolat-Gehalt bei den hier gezeigten Pflanzen während der Trocknung im Mittel um etwa 5 $\mu\text{mol/g TG}$ ab, dieser Wert entspricht rund 10 % der Ursprungsgehalte.

Besonders deutlich werden die stark ausgeprägten Unterschiede in der individuellen Änderung der Glucotropaeolin-Gehalte. Die beobachtete Schwankungsbreite von einer Abnahme um 24 $\mu\text{mol/g}$ TG bis hin zu einer vermeintlichen Steigerung bis zu 12 $\mu\text{mol/g}$ TG deuten darauf hin, dass die Glucotropaeolin-Gehalte bei den einzelnen Pflanzen zum Teil stark variierten.

Die Ursachen für die sehr unterschiedlich ausfallenden Änderungen des Glucosinolat-Gehaltes während der Trocknung können prinzipiell vielfältig sein. So kann z. B. die Möglichkeit einer *de novo* Synthese des Glucotropaeolins nicht ausgeschlossen werden, doch erscheint sie allerdings aufgrund der Kürze der Trocknungszeit (2-3 d) als sehr unwahrscheinlich. Vielmehr kann angenommen werden, dass die vermeintlichen Zunahmen im Glucotropaeolin-Gehalt auf die starken Schwankungen in den Gehalten zurückzuführen sind, d. h. durch Ungleichverteilungen der Glucotropaeolin-Gehalte in beiden Proben resultieren. Entsprechendes gilt natürlich auch für die Verluste. Allerdings ist hier der Prozentsatz fast doppelt so hoch, so dass als „tatsächlicher“ Verlust etwa 10-20 % der ursprünglichen Gehalte angenommen werden muss. Eine weitere Ursache könnten die ebenfalls individuell sehr unterschiedlich starken Myrosinase-Aktivitäten sein (Kapitel 4.1.2).

4.1.3.4 Korrelation Trocknungsverlust/Myrosinase-Aktivität

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Myrosinase-Aktivität in den Blättern einen wichtigen Einfluss auf die Höhe des Glucosinolat-Verlustes bei der Trocknung haben könnte, wurden im Jahr 2003 neben den individuellen Trocknungsverlusten an Glucotropaeolin auch die dazugehörigen Myrosinase-Aktivitäten der einzelnen Pflanzen bestimmt.

Abbildung 20 (Seite 58) zeigt in einem Balkendiagramm die individuellen Verluste an Glucotropaeolin während der Trocknung im Frischlufttrockenschrank gegen die *in vitro* bestimmten Myrosinase-Aktivitäten (siehe Kapitel 4.1.2) derselben Pflanzen aufgetragen. Aus dieser Graphik wird deutlich, dass die Verluste an Glucotropaeolin während der Trocknung in keinem direkten Zusammenhang mit den *in vitro* messbaren Myrosinase-Aktivitäten stehen, sondern dass weitere Faktoren die Höhe der Verluste an Glucosinolaten während der Trocknung determinieren.

Es ist anzunehmen, dass die Stabilität der zellulären Strukturen bei Trockenstress einen wichtigen Einfluss auf die Höhe der Verluste an Glucosinolaten während der Trocknung hat. In diesem Zusammenhang sollte die Dicke der Zellwände einen wichtigen Faktor darstellen, je stabiler die Zellwände einer Pflanze sind, desto geringer sollte die Wahrscheinlichkeit sein, dass die Zellen während der Trocknung kollabieren und aufgrund der Dekompartimentierungen Glucosinolat-Verluste eintreten.

Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere durch den während der Trocknung einsetzenden Trockenstress induzierte proteinogene Faktoren eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang sei auf die Proteine hingewiesen, die in pflanzlichen

Gewebe an die Myrosinasen binden oder mit ihnen assoziiert sind und somit die *in vivo*-Myrosinase-Aktivität beeinflussen könnten (siehe Kapitel 2.2.5).

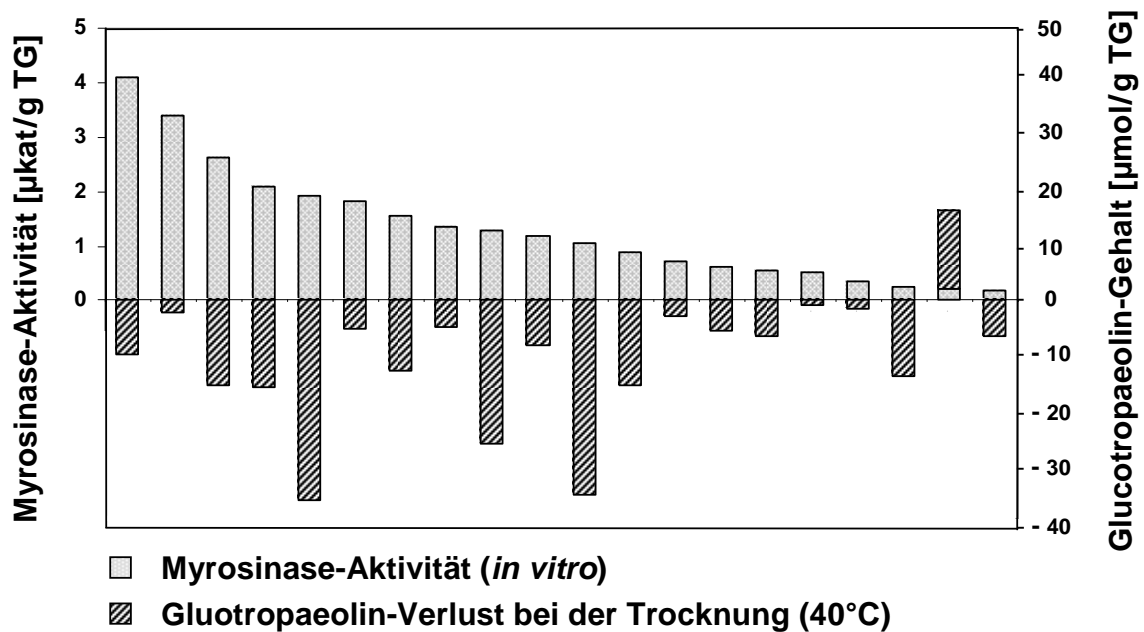


Abbildung 20: Beziehung zwischen Myrosinase-Aktivität und Glucotropaeolin-Verlust in den Blättern einzelner Kapuzinerkressepflanzen während der Trocknung

Für das *screening* ergibt sich aus den gezeigten Ergebnissen, dass die Höhe der *in vitro*-Myrosinase-Aktivität nicht als aussagekräftiges Kriterium zur Selektion von Kapuzinerkressepflanzen mit hohen Wirkstoffgehalten in der Trockendroge herangezogen werden kann. Somit wurde die Bestimmung von Myrosinase-Aktivitäten im weiteren Verlauf des *screenings* aufgegeben, so dass die beiden Parameter Myrosinase-Aktivität und Ascorbinsäure-Gehalt (siehe Kapitel 4.1.1) als Auswahlkriterien für pharmazeutisch hoch geeignete Kapuzinerkressevarietäten ausscheiden. Letztendlich wurden lediglich die Höhe der Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge, der Wuchs und die Eignung für die *in vitro*-Kulturtechnik als Parameter zur Selektion herangezogen.

4.1.4 Screening: Auswahl der Pflanzen für die *in vitro*-Kultur

In Tabelle 2 werden die im Zuge des gesamten *screenings* ermittelten Glucosinolat-Gehalte zusammengefasst. In fünf Ernteeinsätzen wurden etwa 200 Pflanzen beprobt. Aus den tatsächlichen Glucosinolat-Gehalten und den Gehalten an Glucotropaeolin nach der Trocknung im Frischlufttrockenschrank bei 40°C wurden für jede einzelne Pflanze die individuellen Trocknungsverluste an Glucotropaeolin ermittelt.

In den einzelnen Jahren variierte der mittlere Glucosinolat-Gehalt (nach Gefriertrocknung) in der Trockendroge zwischen 47,07 und 78,64 $\mu\text{mol/g TG}$, wohingegen die Glucosinolat-

Gehalte in den Blattmaterialien aus dem Frischlufttrockenschrank insgesamt um rund 20 % niedriger lagen und zwischen 35,97 und 62,92 $\mu\text{mol/g}$ TG schwankten. Es scheint, dass die Verluste an Glucosinolaten bei achtsamer Ernte der Blätter und anschließender Trocknung im Frischlufttrockenschrank bei 40°C durchschnittlich auf ungefähr 20 % begrenzt werden können.

Chargen	Anzahl	GTL-Gehalt (Mittelwert)		Änderung GTL-Gehalt [%]
		gefriergetrocknet [$\mu\text{mol/g}$ TG]	bei 40°C getrocknet	
FL 1-63 (03)	27	57,79	49,49	-14,36
BG 1-33 (03)	33	61,63	39,00	-34,07
FL 64-98 (04)	35		59,61	
BG 35-89 (04)	55	78,64	62,92	-19,99
BG 91-139 (05)	49	47,07	45,01	-4,38
gesamt/MW	199	62,35	50,54	-18,94

Tabelle 2: Glucosinolat-Gehalte in den einzelnen Chargen der Jahre 2003-2005 und die daraus ermittelten Trocknungsverluste an Glucotropaeolin

(FL=Versuchsfläche Inst. für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig; BG=Versuchsfläche Bot. Garten, Braunschweig)

Die zu beobachtende Variabilität in den Glucosinolat-Gehalten der Trockendrogen der einzelnen Chargen und die unterschiedlich ausfallenden Trocknungsverluste an Glucotropaeolin bei den einzelnen Ernten decken sich mit der natürlichen Variationsbreite der Glucosinolat-Gehalte in *Tropaeolum majus* (siehe auch 4.1.3.2-3). Die erzielten Glucotropaeolin-Gehalte werden aber nicht nur durch die individuellen Eigenschaften der jeweiligen Pflanze, sondern auch durch andere Faktoren wie den Erntezeitpunkt, Schwankungen in der Versorgung mit Nährstoffen und auch durch die klimatischen Begebenheiten der jeweiligen Kulturperiode geprägt.

Da alle hier vorgestellten Glucotropaeolin-Gehalte an Pflanzen ermittelt wurden, die unter vergleichbaren Anbaubedingungen kultiviert wurden und auch die Erntezeiten nahezu gleich waren, können die hier gezeigten Daten als Basis für die Selektion von Kapuzinerkresse-Varietäten zur pharmazeutischen Nutzung herangezogen werden. Demnach wurde als Hauptkriterium für die Überführung einer Pflanze in die Stammerhaltung der *in vitro*-Kultur der Glucosinolat-Gehalt in der Trockendroge nach der Trocknung im Frischlufttrockenschrank herangezogen, um die Selektion bestmöglich auf die geplanten pharmazeutischen Anwendungen abzustimmen.

Die Parameter Ascorbinsäure-Gehalt und Myrosinase-Aktivität konnten aufgrund ihrer mangelnden Relevanz in Bezug auf die erzielbaren Glucosinolat-Gehalte in der Trockendroge für das *screenings* vernachlässigt werden (siehe 4.1.2 und 4.1.3.4). Der Wuchs, die Biomasseproduktion und die Gestalt der Pflanzen in der Regel bereits im Vorfeld der

Probennahmen dadurch berücksichtigt, dass Pflanzen mit niedriger Biomasseproduktion oder starker Neigung zum Ranken nicht in das *screening* aufgenommen wurden, spätestens jedoch bei der Überführung glucosinolatreicher Pflanzen in die *in vitro*-Kultur, wurden die Pflanzen mit ungeeigneten Wuchseigenschaften nicht mitberücksichtigt (siehe unten).

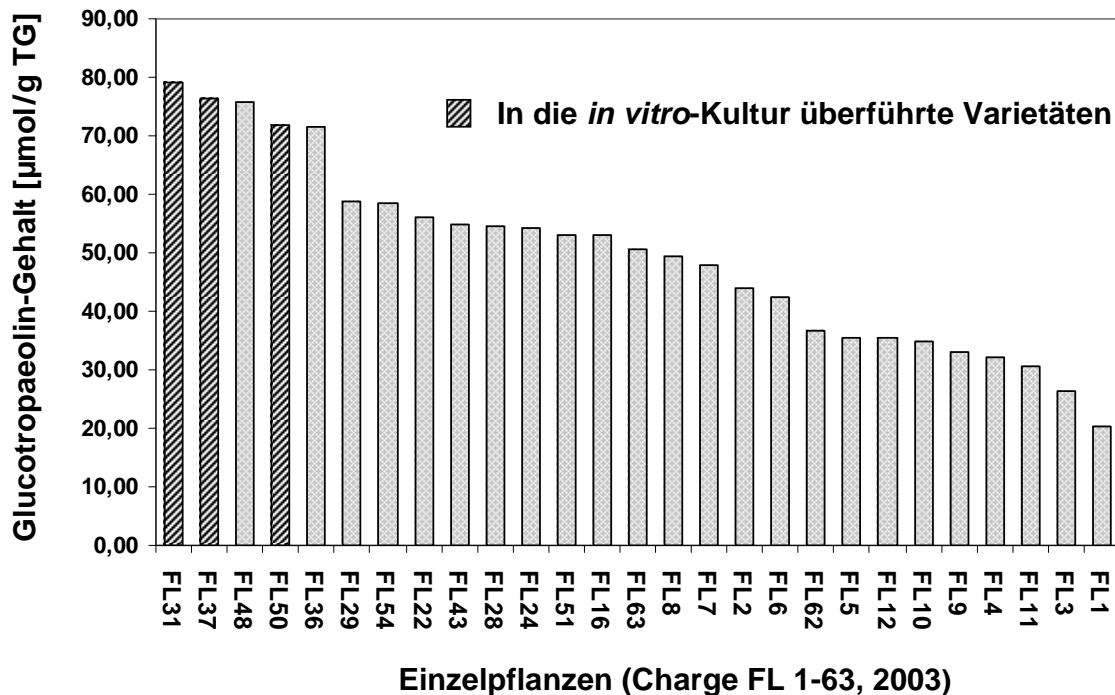


Abbildung 21: Variationsbreite in den Glucosinolat-Gehalten der Pflanzen der Charge FL 1-63 (Frischlufdtrocknung (40°C)) und die in die *in vitro*-Kultur überführten Klone
(Mittlerer GTL-Gehalt: 49,49 µmol/g TG; Standardabweichung: 4,06 %)

Abbildung 21 zeigt die Variationsbreite in den Glucotropaeolin-Gehalten der Pflanzen der ersten Erntecharge der Saison 2003 von der Versuchsfläche am Institut für Pflanzenbiologie, Mendelssohnstraße 4, in Braunschweig. Von den insgesamt 27 Pflanzen, die untersucht wurden, wurden drei besonders glucosinolathaltige Pflanzen in die *in vitro*-Kultur überführt. Hierbei handelt es sich um die Pflanzen FL 31 (78,99 µmol/g TG), FL 37 (76,42 µmol/g TG) und FL 50 (71,69 µmol/g TG). Wohingegen die Pflanze FL 48, die zwar einen hohen Glucotropaeolin-Gehalt von 75,91 µmol/g TG in der Trockendroge aufwies, aufgrund ihrer geringen Biomasseproduktion aber nicht in die *in vitro*-Kultur überführt wurde.

Aufgrund der Ergebnisse der Analysen des *screenings* der Jahre 2003-2005 und der Daten der ersten Feldversuche mit den Regeneraten in den Jahren 2005 und 2006 wurden insgesamt acht Kapuzinerkresse-Klone zur langfristigen Stammerhaltung mittels *in vitro*-Kulturtechnik übernommen (Tabelle 3). Hierbei handelt es sich um die Pflanzen BG 81, FL 31, BG 75, FL 37, FL 50, BG 104, BG 105 und BG 8. Zudem sind in der Tabelle die tatsächlich erreichbaren Glucosinolat-Gehalte im Trockenmaterial, neben den Gehalten in der

Trockendroge (Frischlufттrocknung bei 40°C) und den daraus ermittelten Änderungen im Glucosinolat-Gehalt während der Trocknung aufgelistet.

Pflanze	GTL-Gehalt		Änderung GTL Gehalt [μmol/g TG]
	gefriergetrocknet [μmol/g TG]	bei 40°C getrocknet	
BG 81	95,53	100,90	+5,37
FL 31	92,93	78,99	-13,94
BG 75	81,32	81,48	+0,16
FL 37	81,77	76,42	-5,35
FL 50	73,50	71,69	-1,81
BG 104	65,10	70,38	+5,28
BG 105	71,52	68,20	-3,32
BG 8	130,01	67,50	-62,51

Tabelle 3: Glucosinolat-Gehalte der Klone, die in die Stammerhaltung überführt wurden

Zusätzlich zu den in Tabelle 3 gezeigten acht Klonen wurden zunächst aber sechs weitere Klone im Zuge des *screenings* ausgewählt und in die *in vitro*-Kultur überführt. Diese Klone mussten aber wieder aus der Stammerhaltung heraus genommen werden, da sie entweder zu niedrige Vermehrungsraten für eine erfolgreiche Massenvermehrung aufwiesen (siehe Kapitel 4.1.5) oder deren Regenerate sich für den Feldanbau nicht geeignet zeigten (z. B. BG 26, siehe Kapitel 4.1.6).

4.1.5 Stammerhaltung: *in vitro*-Kultur der Kapuzinerkresse

Die im *screening* ausgewählten Kapuzinerkressepflanzen wurden erfolgreich in die *in vitro*-Kultur auf Festmedien überführt (Abbildung 22). Eine Vielfachsprossbildung wurde mittels der Phytohormone TDZ (0,1 ppm) und IES (0,5 ppm) induziert (siehe Kapitel 6.7).

Für die Stammerhaltung und Vermehrung der Klone per *in vitro*-Kultur wurde die Vielfachsprossbildung ausgewählt, da die spezifischen Ausprägungen des Sekundärstoffwechsels der Mutterpflanzen (Höhe des Glucosinolat-Gehaltes) bei dieser Methode vermutlich am besten aufrechterhalten werden können.



Abbildung 22: *in vitro*-vermehrte Kapuzinerkressepflanzen (Klon FL 37) auf Agarose-Festmedium

Das Medium enthält 0,1 ppm TDZ/0,5ppm IES zur Vielfachsprossbildung (Murashige und Skoog, 1962).

Wegen der Neigung zur somaklonalen Variabilität scheinen Zellsuspensions- und Kalluskulturen für die Bewahrung der biochemischen Eigenschaften selektierter Kapuzinerkresse-Mutterpflanzen ausgesprochen ungeeignet.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Methoden der *in vitro*-Kulturtechnik, bei denen undifferenzierte Zellen der Stammerhaltung dienen, wie z. B. der Kallus- und der Zellsuspensionskultur, hat die Vielfachsprossbildung den Vorteil, dass intakte vollständig differenzierte Pflänzchen kultiviert werden. Dadurch wird vermieden, dass bei der erneuten Regeneration von Pflanzen aus den *in vitro*-Pflänzchen somaklonale Variationen auftreten, die den Verlust oder eine Änderung der erwünschten Eigenschaften (z. B. hoher Glucosinolat-Gehalt) bedingen würden.

Für die Produktion von Metaboliten des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels ist eine Differenzierung der Zellen und die Organisation der Zellen in Geweben oftmals eine notwendige Voraussetzung, weshalb in undifferenzierten pflanzlichen Zellkulturen

allgemeinhin niedrigere Sekundärstoff-Gehalte als in den vollständig differenzierten vorzufinden sind.

4.1.5.1 Glucosinolat-Gehalte in den *in vitro*-Pflanzen

Für eine wirkstoffoptimierte Nutzung der Kapuzinerkresse als Heilpflanze erscheint es unabdingbar, die Wirkstoffgehalte auf allen Ebenen der Produktion lückenlos nachzuvollziehen. So sollten die Glucotropaeolin-Gehalte der Mutterpflanzen, der *in vitro*-Pflanzen, der Regenerate im Feldanbau und in der Trockendroge stets ermittelt werden.

Die Sichtung der wissenschaftlichen Literatur offenbarte, dass auch die Gehalte an Glucosinolaten in den undifferenzierten Zellclustern der meisten *in vitro*-Kulturtechniken niedriger liegen als in intakten vollständigen Pflanzen oder organisierten Geweben.

Für Zellsuspensionskulturen von *Tropaeolum* und *Brassica napus* wurde gezeigt, dass sich im Vergleich zu den Ursprungspflanzen lediglich sehr geringe Mengen an Glucosinolaten nachweisen lassen (Kirkland et al., 1971; Grootwassink et al., 1990).

Auch die Kalli von *Tropaeolum* weisen sehr niedrige Glucotropaeolin-Gehalte auf. In Kalli von *Brassica napus* scheint die Synthese der Glucosinolate nahezu vollständig eingestellt zu sein (Wielanek und Urbanek, 1999; Afzalpurkar, 1974).

Völlig anders verhält es sich in *hairy root*-Kulturen von *Tropaeolum majus*, in diesen werden auf das Trockengewicht bezogen vergleichbar hohe Glucosinolat-Gehalte wie in den Blättern intakter Pflanzen vorgefunden (Wielanek und Urbanek, 1999). In *hairy root*-Kulturen ist offensichtlich aufgrund der vorliegenden Differenzierung und zellulären Organisation die Synthese und die Akkumulation von Glucotropaeolin möglich. Auch die Synthesen und Akkumulation anderer Sekundärstoffe konnten in *hairy root*-Kulturen bereits erfolgreich nachgewiesen werden (Shanks und Morgan, 1999). Da die *hairy root*-Kulturen zudem in flüssigen Medien kultiviert werden, aus denen exkretierte Sekundärstoffe besonders leicht isoliert werden können, eignen sie sich besonders gut für die biotechnologische Produktion pflanzlicher Wirkstoffe (Yonemitsu et al., 1990; Gränicer et al., 1992).

In Bezug auf die *Tropaeolum*-Pflänzchen in der Vielfachsprousbildung (multiple shoot formation-Kulturen) ergibt sich aus den verfügbaren Informationen über die anderen Kulturtechniken die Frage, ob und inwieweit sich die Glucotropaeolin-Gehalte in den *in vitro*-Pflanzen der Vielfachsprousbildung im Vergleich zu den Ursprungspflanzen verändern.

Für die Bestimmung von Glucosinolat-Gehalten in den wesentlich kleineren *in vitro*-Pflanzen, musste die auf das *screening* von Freilandpflanzen abgestimmte Methode adaptiert und optimiert werden. Aufgrund der sehr viel kleineren Blattmassen mussten die verwendeten Volumina drastisch reduziert werden. Durch die Verwendung von lediglich 200 µL

Extraktionsmedium und von Mikrovials wurde es möglich die Glucosinolat-Gehalte von Proben mit lediglich 1 mg Trockengewicht zu bestimmen.

Als Versuchspflanzen wurden die Klone FL 08, FL 37 und FL 50 ausgewählt. Aus dem *screening* des Vorjahres waren bereits die Glucosinolat-Gehalte in den Blättern der Ursprungspflanzen bekannt, die tatsächlichen Glucotropaeolin-Gehalte variierten zwischen 81,77 $\mu\text{mol/g TG}$ in FL 37 und 65,05 $\mu\text{mol/g TG}$ in der Pflanze FL 08 (Abbildung 23).

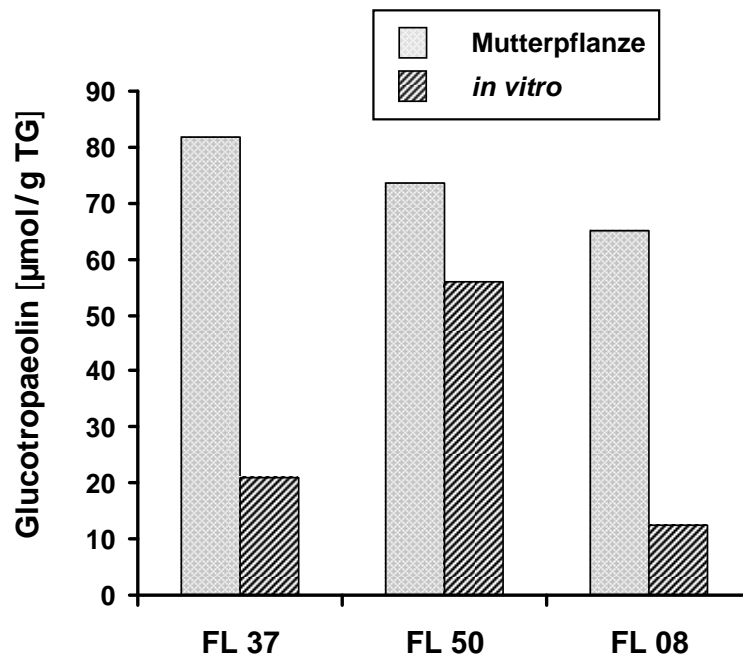


Abbildung 23: Vergleich der Glucotropaeolin-Gehalte in den Blättern der Mutterpflanzen (Freiland) mit denen der daraus regenerierten *in vitro*-Pflänzchen (Standard MS-Medium)

Für die Bestimmung der Glucosinolat-Gehalte in den *in vitro*-Pflanzen wurden sämtliche Blätter der Pflanzen in den Kulturgefäßen geerntet, unverzüglich in Stickstoff schockgefroren, homogenisiert und anschließend gefriergetrocknet. Aliquots von 1-5 mg der gefriergetrockneten Blatthomogenate wurden den Glucosinolat-Bestimmungen zugeführt.

In den *in vitro*-Pflanzen lagen die Glucosinolat-Gehalte signifikant niedriger als in den Ursprungspflanzen des Freilandanbaus. Sie variierten zwischen rund 10 $\mu\text{mol/g TG}$ in FL 08 und 55 $\mu\text{mol/g TG}$ in FL 50 und betrugen somit lediglich zwischen 15 und 75 % der ursprünglichen Glucosinolat-Gehalte in den Mutterpflanzen.

Hinsichtlich der beobachteten Verminderung der Glucosinolat-Gehalte in den *in vitro*-Pflanzen erwuchs die Frage, ob es sich um eine generelle Charakteristik der *in vitro*-Kultur handelt, wie dies bereits im Fall der Kallus- und Suspensionskulturen beobachtet wurde, oder ob die Höhe der Glucosinolat-Gehalte möglicherweise aufgrund der Verfügbarkeit von

Schwefel im Medium limitiert sein könnte (siehe Kapitel 2.1.4), da die Sulfat-Konzentration im Standard MS-Medium lediglich 1,7 mM SO_4^{2-} beträgt.

4.1.5.2 Einfluss des Sulfat-Gehaltes im Medium auf den GTL-Gehalt

Um die eventuellen Zusammenhänge zwischen dem Sulfat-Gehalt des Kulturmediums und den Glucosinolat-Gehalten in den *in vitro*-Pflanzen zu untersuchen, wurden die drei Klone auf MS-Medien mit variierenden Sulfat-Konzentrationen kultiviert. Die routinemäßig für die Stammerhaltung genutzte MS-Medien Sulfat-Konzentration von 1,7 mM SO_4^{2-} wurde auf 8,3 mM erhöht. Zusätzlich wurden zwei niedrigere Sulfat-Konzentrationen (0,2 und 0,6 mM) in den Medien eingestellt. Nach vierwöchiger Kultivierung wurden die Glucosinolat-Gehalte in den Blättern der *in vitro*-Pflanzen bestimmt.

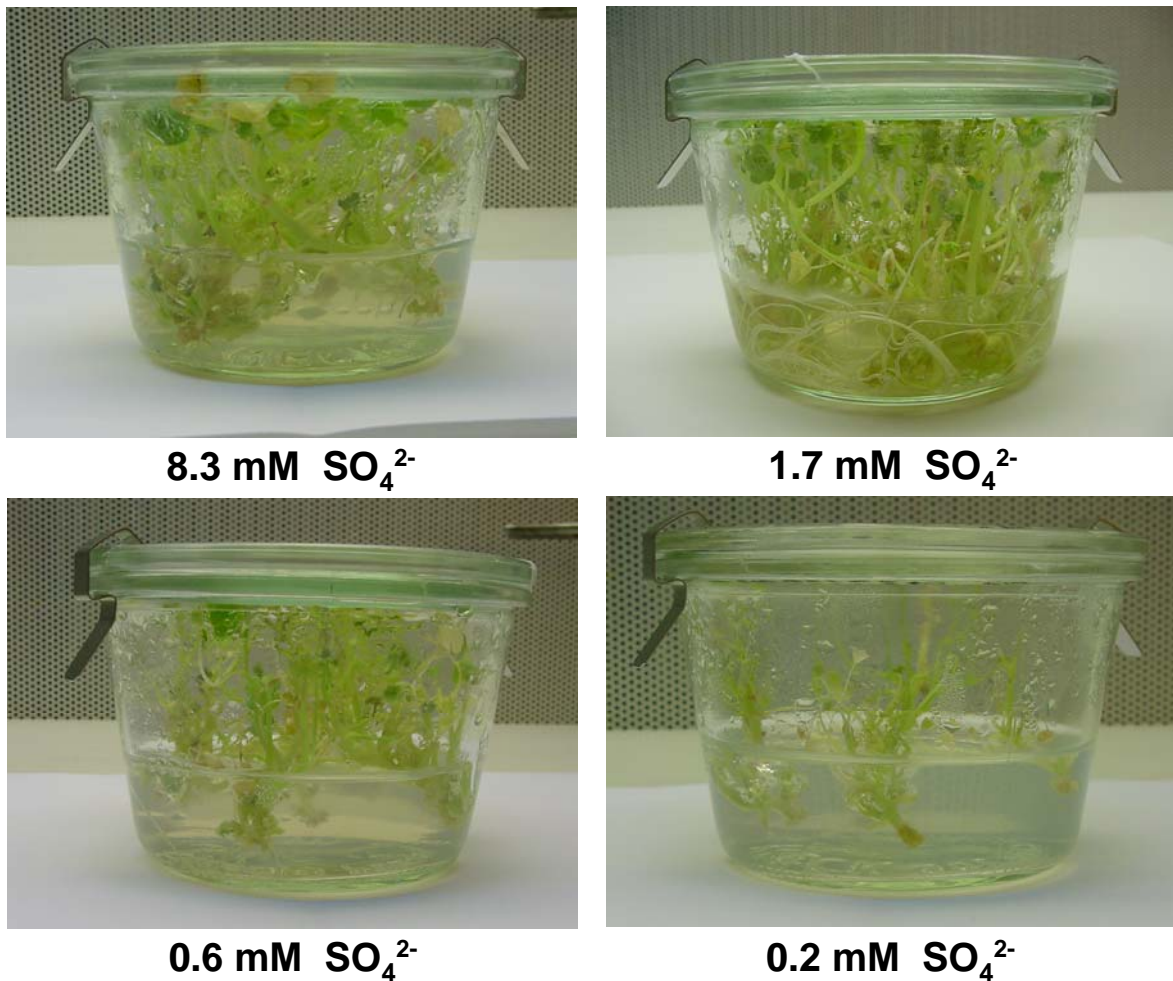


Abbildung 24: *in vitro*-Pflanzen nach vierwöchiger Kultur auf MS-Medien mit unterschiedlichem Sulfat-Gehalt

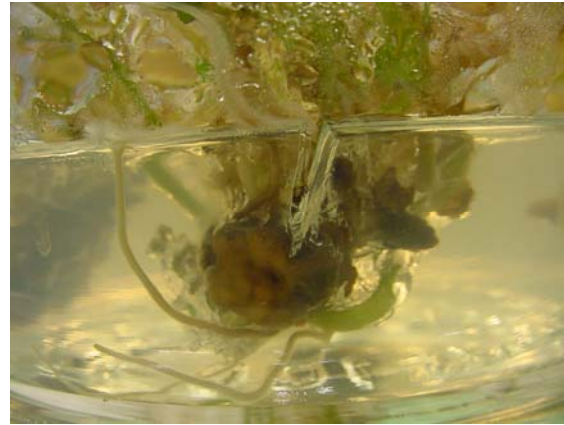
Die *in vitro*-Pflanzen auf den MS-Medien mit dem höchsten Sulfat-Gehalt (8,3 mM) zeigten einen vergleichbaren Wuchs mit dem der auf den Standard-Medien (1,7 mM Sulfat) kultivierten Pflanzen (Abbildung 24). Die *in vitro*-Pflanzen, die auf den Medien verminderten Sulfat-Gehaltes kultiviert wurden wiesen im Vergleich zu den Pflanzen auf den Standard-

Medien (1,7 mM Sulfat) ein deutlich reduziertes Wachstum auf (Abbildung 24). Nach vierwöchiger Kulturzeit betrug der Zugewinn an Biomasse in den Pflanzen, die auf den Medien mit einer Sulfat-Konzentration von 0,6 mM gezogen wurden, lediglich rund 40 % von dem der Pflanzen, die unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Der Habitus dieser Pflanzen war allerdings normal ausgeprägt. Im Gegensatz dazu zeigten die Pflanzen, die auf den Medien mit dem geringsten Sulfat-Gehalt (0,2 mM) wuchsen, ausgeprägte Schwefel-Mangelerkrankungen, wie das Vergilben der Blätter und ein nahezu vollständiges Einstellen des Wachstums.

Charakteristisch für die Pflanzen, die auf Medien mit erhöhtem Sulfat-Gehalt wuchsen sind ein vermindertes Wachstum der Wurzeln sowie das Auftreten von Wucherungen und Verbräunungsreaktionen im Bereich des Hypokotyls und Wurzelansatzes (Abbildung 25).



1,7 mM SO_4^{2-}



8,3 mM SO_4^{2-}

Abbildung 25: Vergleich der Wurzelbildung bei normaler und erhöhter Schwefelversorgung

Im Vergleich zu den Pflanzen, die sich auf Standard MS Medien entwickeln, zeigen die Pflanzen mit erhöhter Schwefelversorgung Wucherungen und Verbräunungsreaktionen im Bereich des Hypokotyls und des Wurzelansatzes.

Die Bestimmung der Glucosinolat-Gehalte in den Blättern der *in vitro*-Pflanzen zeigt die starke Abhängigkeit des Glucotropaeolin-Gehaltes vom Sulfat-Gehalt im Kulturmedium (Abbildung 26, Seite 67). Die Pflanzen, die auf den Medien mit dem moderat gesenkten Sulfat-Gehalt (0,6 mM) gezogen wurden, wiesen deutlich niedrigere Glucosinolat-Gehalte auf als die Pflanzen, die auf den Standard-Medien kultiviert wurden. Die ermittelten Glucosinolat-Gehalte bewegten sich in dem Bereich zwischen 5-10 $\mu\text{mol/g}$ TG und waren somit um 60-80 % niedriger als in den Pflanzen des Standard-Mediums.

Noch wesentlich geringere Glucosinolat-Gehalte wurden für die Pflanzen des Mediums mit dem niedrigsten Sulfat-Gehalt im Medium bestimmt; hier variierten die mittleren Glucosinolat-Gehalte in den Blättern zwischen lediglich 1,4 und 2,6 $\mu\text{mol/g}$ TG.

Die Steigerung des Sulfat-Gehaltes im Medium auf 8,3 mM führte zu einer signifikanten Erhöhung der Glucosinolat-Gehalte in den Blättern. In den *in vitro*-Klonen FL 37, FL 50 und FL 08 wurden Glucosinolat-Konzentrationen von 81, 69 bzw. 58 $\mu\text{mol/g}$ TG ermittelt. Wie Abbildung 27 (Seite 68) eindrucksvoll verdeutlicht, kommen diese Gehalte denen der Ursprungspflanzen im Freiland sehr nahe (FL 37: 81,8 $\mu\text{mol/g}$ TG, FL 50: 73,5 $\mu\text{mol/g}$ TG bzw. FL 08: 65,05 $\mu\text{mol/g}$ TG).

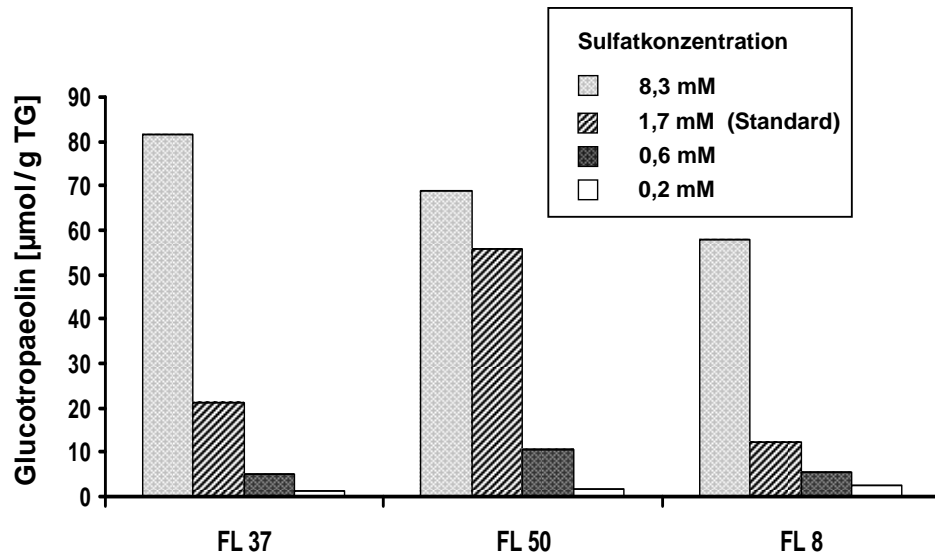


Abbildung 26: Abhängigkeit des Glucosinolat-Gehaltes in den Blättern von *Tropaeolum majus* *in vitro*-Pflanzen vom Sulfatgehalt des Mediums

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die beobachteten Minderungen der Glucosinolat-Gehalte in den unter Standardbedingungen kultivierten *in vitro*-Pflanzen nicht auf allgemeine Effekte der *in vitro*-Kultur zurückzuführen sind. Vielmehr sind die Sulfat-Gehalte in den Medien die entscheidende Einflussgröße, die den resultierenden Glucotropaeolin-Gehalt in den Blättern bestimmt.

Ein Vergleich zwischen der verfügbaren Gesamtmenge an Schwefel im Medium und der in der neu gebildeten Biomasse als Glucotropaeolin integrierten Schwefelmenge in den *in vitro*-Pflanzen offenbarte, dass selbst im Standard-Medium vermutlich zwischen 70 und 90 % der gesamten Schwefelmenge im Medium verbleiben*. Ein Versetzen des in Wasser homogenisierten Kulturmediums mit Bariumchlorid, führte in der Tat zu einer starken Fällung weißlichen Bariumsulfates, womit aufgezeigt wird, dass in dem Standard-Medium auch nach vierwöchiger Kulturzeit noch größere Mengen an Sulfat enthalten sind.

* 100 mL MS Standard Medium (1,7 mM SO_4^{2-}) enthalten eine Gesamtmenge von 170 μmol Sulfat. Die *in vitro*-Pflanzen in den Kulturgefäßen bildeten pro Kulturzeitraum rund 5 g Biomasse. Diese Menge frischen Blattmaterials entspricht etwa 500 mg gefriergetrockneter Trockendroge. Die untersuchten Klone enthielten mittlere Glucosinolat-Gehalte zwischen 10-55 $\mu\text{mol/g}$ TG (Abbildung 26), so dass pro Kulturgefäß zwischen 5-30 μmol Sulfat in neu gebildetes Glucotropaeolin integriert wurden. Dieser Wert entspricht lediglich rund 5-20 % des gesamten im Medium enthaltenen Sulfats.

Somit wird die Höhe der Glucosinolat-Gehalte nicht durch die enthaltene Menge an Sulfat im Medium beschränkt, sondern vielmehr durch die begrenzte Fähigkeit der *in vitro*-Pflanzen dieses Sulfat aufzunehmen.

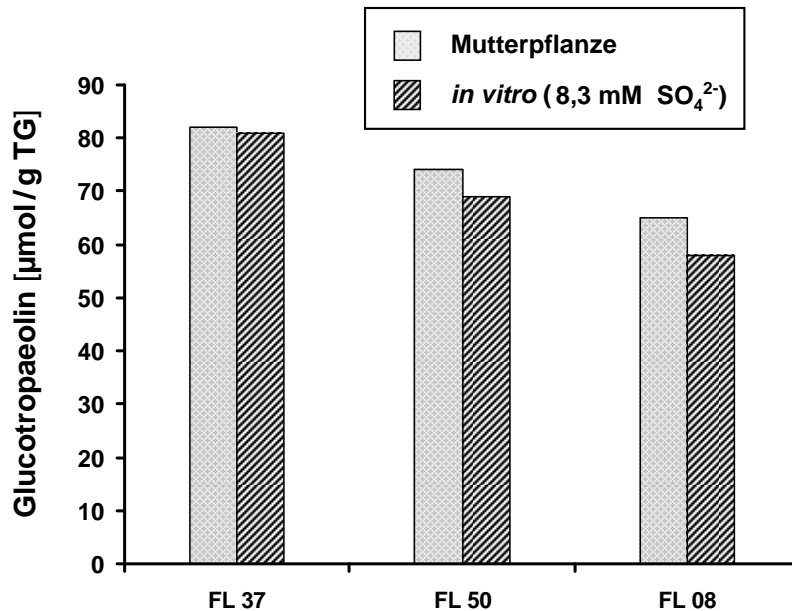


Abbildung 27: Vergleich der Glucosinolat-Gehalte der Blätter der Mutterpflanzen mit dem der *in vitro*-Pflanzen, die auf dem Medium ohne Schwefelmangel (8,3 mM) kultiviert wurden.

Unterstützt wird diese Hypothese auch durch Daten von Wielanek und Urbanek (1999) zu *hairy root*-Kulturen von *Tropaeolum majus*. Die Autoren fanden in den *hairy root*-Kulturen vergleichbar hohe Glucosinolat-Gehalte, wie sie in intakten Pflanzen vorgefunden werden, obwohl die Konzentration der Schwefelquelle Cystein im Medium lediglich bei 0,6 mM liegt. Dies wird damit erklärt, dass die *hairy roots* mit ihrer stark vergrößerten Oberfläche wesentlich besser dazu befähigt sind, Nährstoffe aus dem sie umgebenen Flüssigmedium aufzunehmen als die *in vitro* Pflänzchen mit ihrem vergleichsweise geringem Wurzelwerk. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass die *hairy root*-Kulturen in Flüssigmedium kultiviert werden, das permanent geschüttelt wird, während die *in vitro* Pflanzen auf Festmedium wachsen, in dem die Diffusion deutlich eingeschränkt ist.

Abschließend ist anzumerken, dass die *in vitro*-Systeme der Kapuzinerkresse sehr gut dazu geeignet sein sollten modellhaft Einflussgrößen auf die Höhe der Glucosinolat-Gehalte zu untersuchen, da die Kulturbedingungen genau kontrollierbar sind und Kreuzbeeinflussungen durch Pathogene und Verletzungen ausgeschlossen werden können. Des Weiteren könnten anhand der Analytik der flüchtigen Substanzen in der Umluft der *in vitro*-Pflanzen auch chemisch ökologische Wechselwirkungen mit anderen Organismen (wie z.B. Schadinsekten oder natürliche Feinde der Schadinsekten) tiefer gehend erforscht werden.

4.1.5.2 Massenvermehrung der Kapuzinerkresse

Die Stammerhaltung der im *screening* aufgrund ihrer hohen Glucosinolat-Gehalte ausgewählten Kapuzinerkressepflanzen erfolgte sowohl am Institut für Pflanzenbiologie (Braunschweig) als auch am Institut für Pflanzenkultur (Schnega). In den Jahren 2005 und 2006 wurden am Institut für Pflanzenkultur die Massenvermehrung und Akklimatisierung der Kapuzinerkresse-Klone für den Feldanbau durchgeführt (Abbildung 28).



Abbildung 28: Massenvermehrung der selektierten Kapuzinerkressepflanzen am Institut für Pflanzenkultur, Schnega

1. Massenvermehrung auf MS-Medium (Vielfachsprossbildung); 2. Massenvermehrung im TIS (Temporary Immersion System); 3. Akklimatisierung der regenerierten Pflanzen im Folienhaus; 4. Transport der Pflanzpaletten zum Versuchsfeld (FAL, Braunschweig, 25. 05. 2005)

In der Praxis erwies sich für die Massenvermehrung die etablierte Methode der Vielfachsprossbildung auf Festmedien als am besten durchführbar. Obwohl die Pflanzen im automatisierten Temporary Immersion System (TIS) im Vergleich zur bereits etablierten *in vitro*-Vermehrung auf Festmedien deutlich höhere Vermehrungsraten und Biomasseproduktionen aufwiesen lohnte sich der routinemäßige Einsatz nicht, da der Arbeitsaufwand und die damit verbundenen Lohnkosten unverhältnismäßig hoch ausfallen (Kleinwächter et al., 2007).

Die bewurzelten *in vitro*-Pflanzen wurden auf gedüngtes Torfsubstrat in Pikierplatten ausgebracht und vorsichtig in Folienhäusern bei gleich bleibender Temperatur (20°C) und hoher Luftfeuchtigkeit für einige Wochen akklimatisiert. Nach dieser für die empfindlichen Jungpflanzen besonders schwierigen Akklimatisierungsphase erfolgten der Transport nach Braunschweig und das Auspflanzen auf dem Versuchsfeld (Abbildung 28).

Bereits im ersten Jahr der Feldversuche (2005) wurde die Kultivierung der Kapuzinerkresse im semiindustriellen Maßstab erprobt. Entsprechend fiel die Anzahl der ausgebrachten Pflanzen mit 10020 Stück wesentlich höher aus als im Folgejahr 2006, in dem lediglich 2800 Pflanzen angebaut wurden (Tabelle 4).

Somit wurden in den beiden Jahren der Feldversuche insgesamt fast 13 000 Regenerate sechs verschiedener Varietäten im Feldanbau erprobt (Tabelle 4).

Klon	Anzahl	
	2005	2006
FL 37	3 480	1 200
BG 08	3 420	1 200
BG 26	2 940	
FL 31	180	
BG 81		200
LR 01		200
gesamt	10 020	2 800

Tabelle 4: Anzahl der *in vitro* vermehrten Klone im Feldanbau (2005/2006)

Nach den Erfahrungen des ersten Anbaujahres wurden die Klone BG 26 und FL 31 für den Feldanbau nicht mehr berücksichtigt und aus der Stammerhaltung herausgenommen. Der Anbau der Varietät BG 26 wurde aufgegeben, da die regenerierten Pflanzen dieses Klons zwei unterschiedliche Phänotypen aufwiesen (siehe Kapitel 4.1.6). Die Varietät FL 31 eignet sich wegen ihrer niedriger als erwartet ausfallenden Vermehrungsrate nicht für die Massenvermehrung. Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass von diesem Klon während der für alle Klone gleich langen Phase der Massenvermehrung nur 180 Regenerate erzeugt werden konnten, diese Anzahl entspricht nur etwa 1/20 der des Klones FL 37 (3480 Stück).

Zusätzlich wurden im Feldversuch 2006 der im *screening* des Vorjahres (2005) selektierte Klon BG 81 und der vom Institut für Pflanzenkultur wegen seiner Wüchsigkeit ausgewählte Klon LR 01 in den Anbauversuch integriert.

4.1.6 Pilotproduktion: die Regenerate im Feldversuch

Die vom Institut für Pflanzenkultur in den Jahren 2005/2006 angelieferten Regenerate wurden umgehend auf dem Versuchsfeld des Institutes für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL, Braunschweig ausgepflanzt (Abbildung 29). Die Pflanzungen erfolgten in den beiden Jahren jeweils in der letzten Maiwoche, um sicherzustellen, dass die empfindlichen Jungpflanzen nicht durch die häufig noch bis Mitte Mai in der Region Braunschweig auftretenden Nachtfröste geschädigt werden.



Abbildung 29: Die Regenerate im Feldversuch (FAL, 2005)

Gemeinschaftliche Pflanzung von rund 10000 Klonen am 25.05.05

Anhand von Variationen der Bedingungen des Feldanbaus sollte weitergehend überprüft werden, inwieweit sich die Glucosinolat-Gehalte in den Blättern steigern lassen und somit sich die landwirtschaftliche Nutzbarkeit dieser Pflanze verbessern lässt. Die im Versuchsfeld durchgeführten Variationen im Anbau und die durchgeführten Messreihen werden im Folgenden kurz vorgestellt:

Die Düngung wurde im ersten Jahr des Versuches mit zwei unterschiedlichen Schwefelgaben in den Parzellen durchgeführt (-S: kein S und 100 kg N/ha; +S: 100 kg S/ha und 100 kg N/ha), um den Einfluss der Schwefeldüngung auf den Glucotropaeolin-Gehalt in den Klonen erfassen zu können (Siehe Abbildung 30). Im zweiten Jahr des Versuches wurde lediglich die auf die erzielbaren Glucotropaeolin-Erträge optimierte Düngung von 100 kg S und 100 kg N/ha angewandt.

Als weiterer Parameter des Anbaus wurde im Jahr 2006 der Pflanzabstand variiert. Die Pflanzen wurden mit Pflanzabständen von 30 oder 60 cm gepflanzt, um erfassen zu können, inwieweit sich der Pflanzabstand auf die erzielbaren Glucosinolat-Gehalte in den Blättern auswirkt.

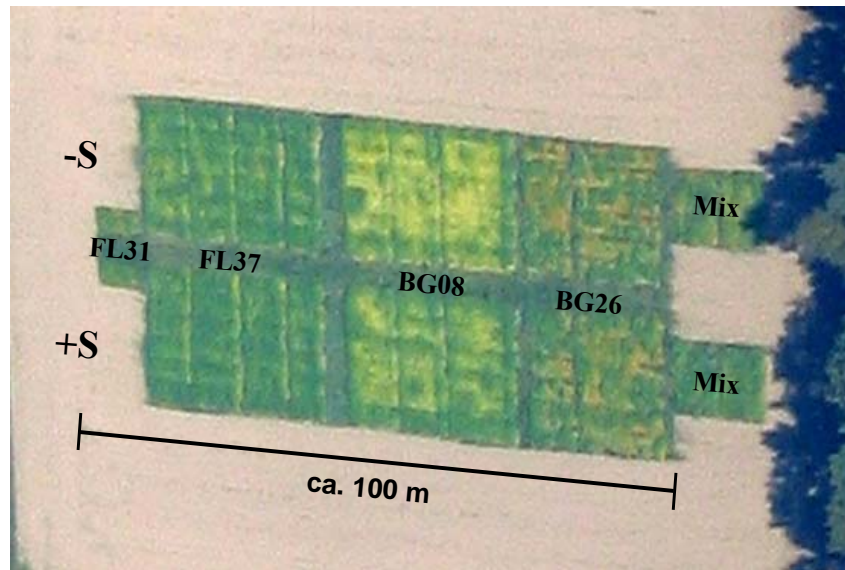


Abbildung 30: Luftbild des Feldversuchs im Jahr 2005

Deutlich sind die einzelnen Klone erkennbar, aufgrund der Düngung mit Schwefel weisen die Pflanzen der unteren Hälfte des Versuchsfeldes (+S) eine intensivere Grünfärbung auf als die der oberen (-S).

(das Foto wurde freundlicherweise von Anja Brauer und Juliane Thiele zur Verfügung gestellt, FAL Braunschweig)

Von den Kooperationspartnern des Institutes für Pflanzenernährung und Bodenkunde (FAL, Braunschweig) wurden in erster Linie Untersuchungen zu den landwirtschaftlichen Aspekten in der Nutzung der Kapuzinerkresse durchgeführt; hierzu zählen z.B. die Auswirkungen der Anbaubedingungen auf die Glucosinolat-Gehalte (Düngung/Pflanzabstand). Zusätzlich wurden im Rahmen des Projektes noch weitere für die landwirtschaftliche Nutzung relevante Parameter der Pflanzen analysiert. Hierzu zählen vor allem organ- und entwicklungsspezifische Unterschiede in den Glucosinolat-Gehalten, sowie die jeweilige Produktion an Biomasse der einzelnen Klone und die Blatt:Stängel-Verhältnisse der einzelnen Varietäten.

In den folgenden Kapiteln werden vor allem die Variationsbreiten der Glucosinolat-Gehalte der Einzelpflanzen der Kapuzinerkresse-Klone sowie die mittleren Glucosinolat-Gehalte der Regenerate vorgestellt. Des Weiteren werden die entsprechenden Vergleiche zu den Glucosinolat-Gehalten der Ursprungspflanzen und den Pflanzen einer Saatgutmischung im Feldanbau gezogen.

4.1.6.1 Glucotropaeolin-Gehalte in den Regeneraten

Nach rund dreimonatiger Wachstumszeit im Freiland wurden Ende August (2005) bzw. Anfang September (2006) von den Regeneraten Proben genommen. Die Pflanzen hatten zur Zeit der Probennahmen die Phase des generativen Wachstums hinter sich gelassen und auch die Hauptzeit der Blüte durchschritten und befanden sich mehrheitlich in der Spätblüte und Samenreife. An dieser Stelle sei angemerkt, dass sich diese Phasen der pflanzlichen Entwicklung allerdings bei den Kapuzinerkresseklonen nicht eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Vielfach - vom Frühsommer bis zum Einsetzen der ersten Nachtfröste im Spätherbst - wachsen und blühen die Pflanzen parallel. Außerdem zeigen sich auch individuelle Unterschiede in der Entwicklung der Klone.

Für die Glucosinolat-Analysen wurden von den Regeneraten jeweils dreißig Blätter geerntet (siehe *screening* Kapitel 4.1.3.3), die eine Hälfte der Blätter wurde direkt auf dem Feld in Stickstoff schockgefroren, wohingegen die andere Hälfte im Frischlufttrockenschrank bei 40°C getrocknet wurde. Die Ergebnisse zu den Trocknungsversuchen wurden bereits teilweise in Kapitel 4.1.3.3 vorgestellt und ausführlich diskutiert und werden aus diesem Grund nicht noch einmal im Detail aufgeführt.

Um eine hohe Vergleichbarkeit der einzelnen Graphen dieses Kapitels gewährleisten zu können, werden durchgängig tatsächliche Glucosinolat-Gehalte gezeigt, die aus auf dem Feld schockgefrorenem und anschließend gefriergetrocknetem Blattmaterial ermittelt wurden. Aus diesem Grund werden auch nur die Glucosinolat-Gehalte von Regeneraten herangezogen, die auch unter vergleichbaren Bedingungen im Feld angebaut wurden (Pflanzabstand: 30 cm, Düngung: +S). Die einzige Ausnahme hiervon stellen die Ursprungspflanzen aus dem *screening* dar, die am Institut für Pflanzenbiologie und im Botanischen Garten in Braunschweig in kleinflächigen Gartenparzellen gesondert kultiviert wurden.

4.1.6.1.1 Variationsbreite der GTL-Gehalte in den Regeneraten

Die Glucosinolat-Gehalte in den Regeneraten des Feldanbaus variierten beträchtlich (Abbildung 31). Die höchste Variabilität in den individuellen Glucosinolat-Gehalten wiesen die Pflanzen des Klones FL 31 auf. Die Einzelpflanzen dieses Klons enthielten zwischen 47 und 78 $\mu\text{mol/g}$ TG Glucotropaeolin. Somit schwanken die Glucosinolat-Gehalte um den Faktor 1,6. Diese Schwankungsbreite der Glucosinolat-Gehalte zwischen den genetisch identischen Klonen ist allerdings noch deutlich niedriger als bei den Pflanzen des *screenings* (Abbildung 19.1 Kapitel 4.1.3.3.1). Zum Vergleich: in den Pflanzen des *screenings* schwankten die Glucosinolat-Gehalte durchgängig mindestens um den Faktor 2 (2005: 33-70 $\mu\text{mol/g}$ TG, entspricht Faktor 2,12).

Der Vergleich der mittleren Glucotropaeolin-Gehalte der einzelnen Klone bestätigt, dass in den Gehalten der Klone FL 37, BG 08 und FL 31 - wie in den Mutterpflanzen - keine

signifikanten Unterschiede bestehen. Die Unterschiede im Wirkstoffgehalt dieser drei Klone betragen nur rund 3 $\mu\text{mol/g}$ TG (FL 37: 63,24 $\mu\text{mol/g}$ TG, BG 08: 65,82 $\mu\text{mol/g}$ TG, FL 31: 62,43 $\mu\text{mol/g}$ TG).

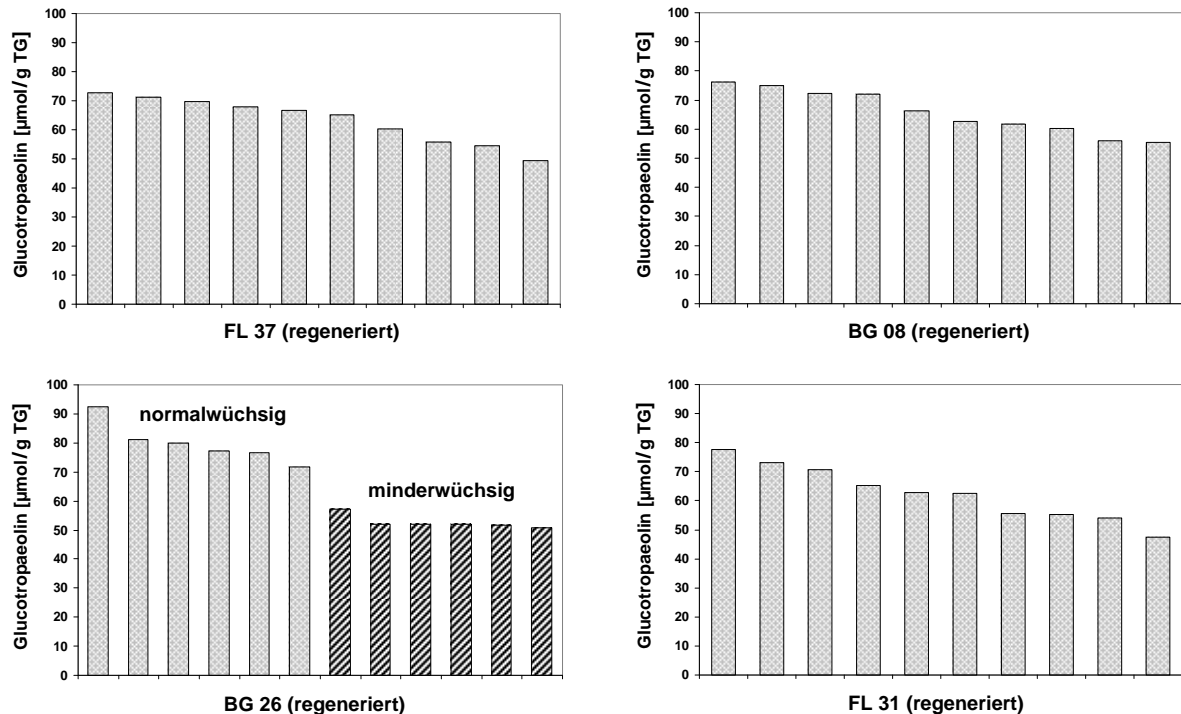


Abbildung 31: Variationsbreite der Glucosinolat-Gehalte in den Regeneraten

Die mittleren Gehalte wurden mit 63,24 (FL 37), 65,82 (BG08), 79,86 bzw. 52,61 (BG 26) sowie 62,43 $\mu\text{mol/g}$ TG (FL 31) bestimmt.

(Düngung: +S, Pflanzabstand: 30 cm, Erntezeitpunkt: 08.09.2005; mittlere Standardabweichung: 11,39 %)

Anders stellt sich die Situation beim Klon BG 26 dar: Die eine Hälfte der Pflanzen dieses Klones wiesen ein normales Wachstum auf (Abbildung 32). Sie enthielten im Vergleich zu den anderen in diesem Jahr angebauten Varietäten die mit Abstand höchsten mittleren Glucotropaeolin-Gehalte. In den Blättern dieser Pflanzen wurden im Mittel Glucosinolat-Gehalte von rund 80 $\mu\text{mol/g}$ TG vorgefunden (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu wuchs die andere Hälfte der Pflanzen dieses Klons nur spärlich (Abbildung 32). In den Blättern fanden sich wesentlich niedrigere Glucotropaeolin-Gehalte von etwa 53 $\mu\text{mol/g}$ TG, was den geringsten Wirkstoffgehalt dieses Feldversuches im Jahr 2005 repräsentiert (Abbildung 31). Die beiden Formen des Klones BG 26 unterscheiden sich somit nicht nur in ihren Phänotypen, sondern auch in ihren Wirkstoffgehalten, die um mehr als 35 % differieren.

Der Klon BG 26 wurde aufgrund seiner Inhomogenitäten im Wuchs und Wirkstoffgehalt aus der Stammerhaltung und dem Feldversuch des Folgejahres herausgenommen (2006).

Im Jahr 2006 wurden zur Verifizierung der ermittelten Wirkstoffgehalte aus dem Vorjahr die Klone BG 08 und FL 37 erneut angebaut, zusätzlich wurden die Klone BG 75, BG 81 und LR 01 in den experimentellen Feldanbau aufgenommen (Tabelle 4 Kapitel 4.1.5.2).



Abbildung 32: Regenerate des Klones BG 26 im Feldversuch (03.08, 2005)

Die regenerierten Pflanzen wiesen zwei verschiedene Wuchsformen auf, ein Teil der Pflanzen zeigte einen normalen Habitus, wohingegen der Rest kärglich wuchs und gelbliche Blätter hatte.

4.1.6.1.2 Vergleich der GTL-Gehalte „Mutterpflanzen“/Regenerate

Werden die mittleren Glucosinolat-Gehalte der Regenerate im Feldversuch mit denen ihrer Ursprungspflanzen verglichen, fällt besonders auf, dass die Regenerate in allen Fällen deutlich niedrigere Wirkstoffgehalte als ihre entsprechenden „Mutterpflanzen“ enthalten (Abbildung 33). Mit einer Abweichung von rund 23 % fällt die Differenz im Glucosinolat-Gehalt der Regenerate des Klons FL 37 zwar noch moderat aus (2005), doch der Gehaltsunterschied zwischen Regeneraten und Mutterpflanze des Klons BG 08 im Jahr 2006 beträgt schon mehr als 50 % und ist durchaus als drastisch zu bewerten. Im Mittel enthielten die Regenerate im Feldanbau etwa 40 % weniger Glucotropaeolin als ihre Mutterpflanzen aus der Gartenkultur.

Die Hauptgründe für die beobachteten Gehaltsunterschiede zwischen Ursprungspflanzen und Klonen dürften in den unterschiedlichen Anbaubedingungen zu finden sein. Die Ursprungspflanzen wurden in kleinen Parzellen im Gartenanbau kultiviert, der Boden war mit Gartenerde und Kompost angereichert, der Pflanzabstand zwischen den einzelnen Pflanzen betrug 1 m und bei eintretender Trockenheit wurden die Pflanzen regelmäßig gewässert.

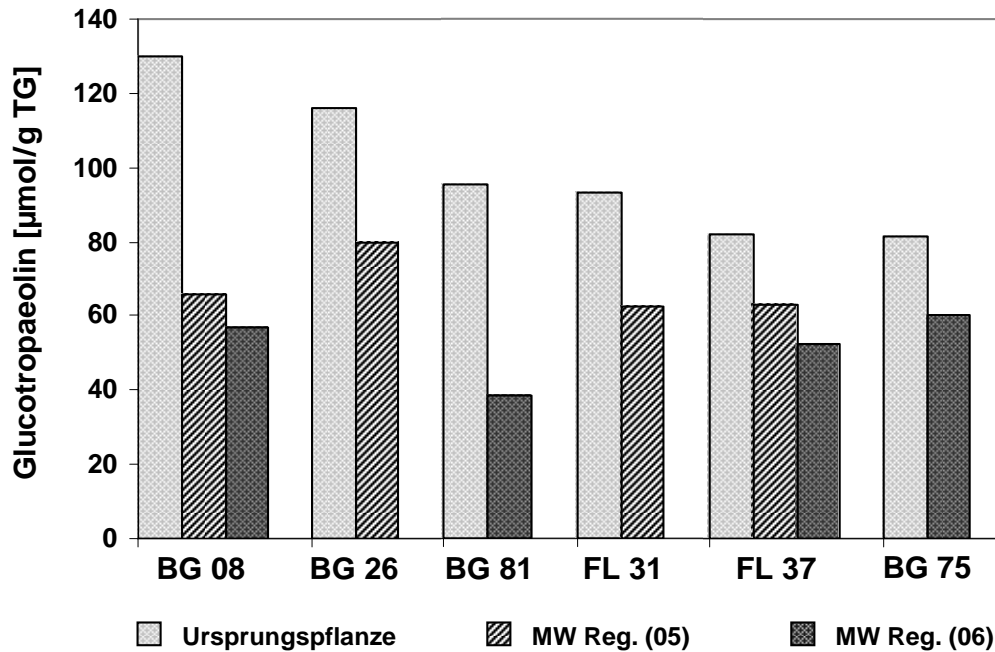


Abbildung 33: Vergleich der Glucotropaeolin-Gehalte der Ursprungspflanzen mit denen der Regenerate

Mittlere Gehalte der Regenerate 05/06: 64,52 / 52,17 µmol/g TG

(Ursprungspflanzen; Düngung: NPK-Dünger, Pflanzabstand: 100 cm)

(Regenerate; Düngung: +S, Pflanzabstand: 30 cm)

Im Gegensatz dazu wurden die Regenerate unter völlig anderen Bedingungen im Feld kultiviert, bei dem Boden handelte es sich um einen sandigen Lehm Boden, der Pflanzabstand betrug 30 cm und die Pflanzen wurden auch nicht zusätzlich bewässert. Auch die Düngergaben waren in den beiden Anbauformen grundsätzlich unterschiedlich: Düngung mit organisch-mineralischem NPK-Dünger im Gartenanbau im Gegensatz zu definierter Düngung mit synthetischem NPK-Dünger und zusätzlicher Ausbringung von elementarem Schwefel (siehe auch Kapitel 6.6.1 / 6.6.2). Diese grundsätzlichen Unterschiede in den Kulturbedingungen der Ursprungspflanzen und Regenerate haben sicherlich einen großen Anteil an den gefundenen Gehaltsunterschieden.

4.1.6.1.3 GTL-Gehalte der Regenerate in den einzelnen Anbaujahren

Ein Vergleich der in den einzelnen Jahren erreichten Glucosinolat-Gehalte zeigt, dass im Jahr 2005 durchwegs bei allen Varietäten höhere Wirkstoffgehalte zu finden waren als im Jahr 2006 (Abbildung 34). Im Jahr 2005 betrug der mittlere Glucotropaeolin-Gehalt in den Blättern sämtlicher Regenerate rund 65 µmol/g TG, wohingegen er im Jahr 2006 mit etwa 52 µmol/g TG um fast 13 µmol/g TG niedriger lag. Dieser Wert entspricht einer Gehaltsdifferenz von nahezu 20 %. Und auch die in beiden Jahren wiederholt angebauten Klone FL 37 und BG 08, enthielten im Jahr 2006 im Mittel rund 15 % weniger

Glucotropaeolin, so enthielten z. B. die Pflanzen des Klones BG 08 im Jahr 2005 rund 65,82 $\mu\text{mol/g}$ TG, wohingegen sie im Jahr 2006 nur Gehalte von 57,03 $\mu\text{mol/g}$ TG aufwiesen.

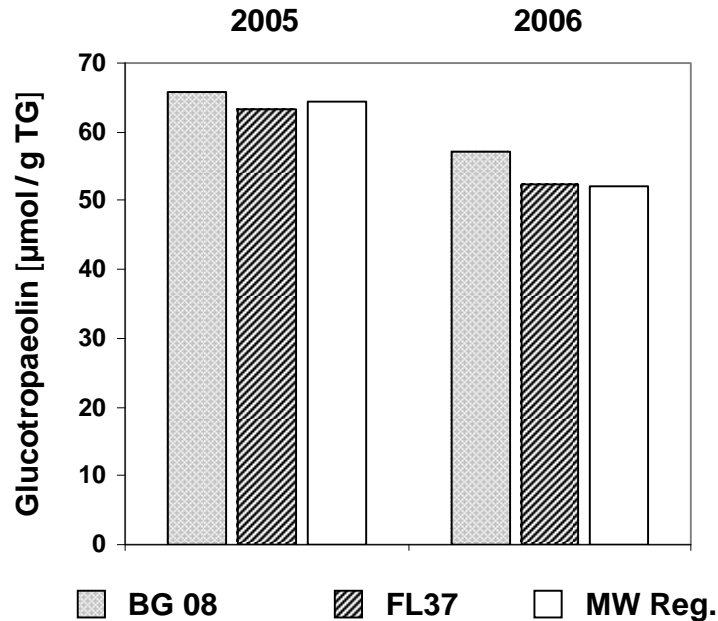


Abbildung 34: GTL-Gehalte der Klone BG 08, FL 37 und mittlerer Gehalt der Regenerate in den einzelnen Anbaujahren (2005/2006)

MW Reg. = mittlerer GTL-Gehalt der gesamten Regenerate eines Anbaujahres
(Standardabweichung 2005/2006: 11,39 % bzw. 2,63 %)

Die Variationen in den Wirkstoffgehalten genetisch identischer Pflanzen verschiedener Anbaujahrgänge lassen sich sicherlich auf die Witterungseinflüsse in den entsprechenden Jahren zurückführen, da sich Unterschiede in den Anbaubedingungen für die Klone FL 37 und BG 08 oder auch genetische Unterschiede ausschließen, da ja die Klone unter definierten Bedingungen angebaut wurden.



Abbildung 35: Der Klon FL 37 im Feldversuch

Einfluss der Witterung auf die Entwicklung der Kapuzinerkresse-Regenerate
Linkes Teilbild 03.08.2005, rechtes Teilbild 04.08.2006

Die Photographien des Klones FL 37 verdeutlichen, dass die Pflanzen im Jahr 2006 unter den extrem niedrigen Niederschlagsmengen in den Monaten Mai bis Juli zu leiden hatten (Abbildung 35). Die Pflanzen produzierten im vergleichbaren Zeitraum wesentlich weniger Biomasse und zeigten, wie im rechten Teilbild zu sehen ist, eindeutige Symptome von Trockenstress (vergilbte Blätter).

Die Probennahmen erfolgten im Jahr 2006 zwar erst Mitte September, bis dahin hatten sich die Pflanzen zumindest rein optisch von den Auswirkungen der extremen Trockenheit erholt. Dennoch könnten die niedrigeren Wirkstoffgehalte in den Pflanzen im Jahr 2006 auf die witterungsbedingt ungünstigeren Wachstumsbedingungen kurz nach der Pflanzung zurückzuführen sein.

Eine Begründung hierfür könnte darin liegen, dass die nur spärlich entwickelten und geschwächten Pflanzen nach den ersten Regenfällen Mitte August in ein kräftiges vegetatives Wachstum übergingen und daher aus einer Art Verdünnungseffekt heraus die mittleren Glucosinolat-Gehalte der Pflanzen niedriger lagen als zur vergleichbaren Zeit des Vorjahres.

4.1.6.1.4 Mittlere GTL-Gehalte der einzelnen Varietäten

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur die Anbau- und Witterungsbedingungen einen hohen Einfluss auf die Höhe der erzielbaren Glucosinolat-Gehalte in der Kapuzinerkresse haben, sondern auch die genetische Determinierung, da die mittleren Glucotropaeolin-Gehalte der einzelnen Klone trotz identischer Anbau- und Witterungsbedingungen signifikant variieren (Abbildungen 33 und 37). Im Jahr 2006 enthielten die Blätter des Klones BG 75 Glucosinolat-Gehalte von rund 60 $\mu\text{mol/g}$ TG, wohingegen die Blätter des Klones BG 81 und LR 1 lediglich Gehalte von etwa 39 bzw. 35 $\mu\text{mol/g}$ TG enthielten. Dies entspricht einem Gehaltsunterschied von 35 % in den untersuchten Klonen im Jahr 2006. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass auch die genetische Prädisposition der einzelnen Varietäten einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Höhe der Glucosinolat-Gehalte hat.

4.1.6.1.5 GTL-Gehalte in den Pflanzen einer Saatgutmischung

Zusätzlich wurde auch die Variationsbreite der Glucotropaeolin-Gehalte der Pflanzen einer genetisch heterogenen Saatgutmischung der Kapuzinerkresse ermittelt, die mit den genetisch homogenen Regeneraten zusammen im Feld unter vergleichbaren Anbaubedingungen kultiviert wurden. Bei dem eingesetzten Saatgut handelte es sich um dieselbe Mischung, aus der auch die Pflanzen des *screenings* in den vorherigen Jahren gezogen wurden, so dass eine vergleichende Beurteilung der erzielten Wirkstoffgehalte ermöglicht wird.

Die Glucosinolat-Gehalte in den Kapuzinerkressenpflanzen der genetisch heterogenen Saatgutmischung im Feldanbau variierten beträchtlich (Abbildung 36). Die Pflanze mit dem niedrigsten Wirkstoffgehalt im gefriergetrockneten Blattmaterial enthielt rund 53 $\mu\text{mol/g}$ TG

Glucotropaeolin, wohingegen der höchste gemessene Glucotropaeolin-Gehalt einer Pflanze mit rund 82 $\mu\text{mol/g}$ TG bestimmt wurde. Die Glucosinolat-Gehalte schwanken somit etwa um den Faktor 1,6. Die Schwankungsbreite der Gehalte in den genetisch inhomogenen Pflanzen entspricht somit annähernd der der genetisch homogenen Regenerate des Klones FL 31.

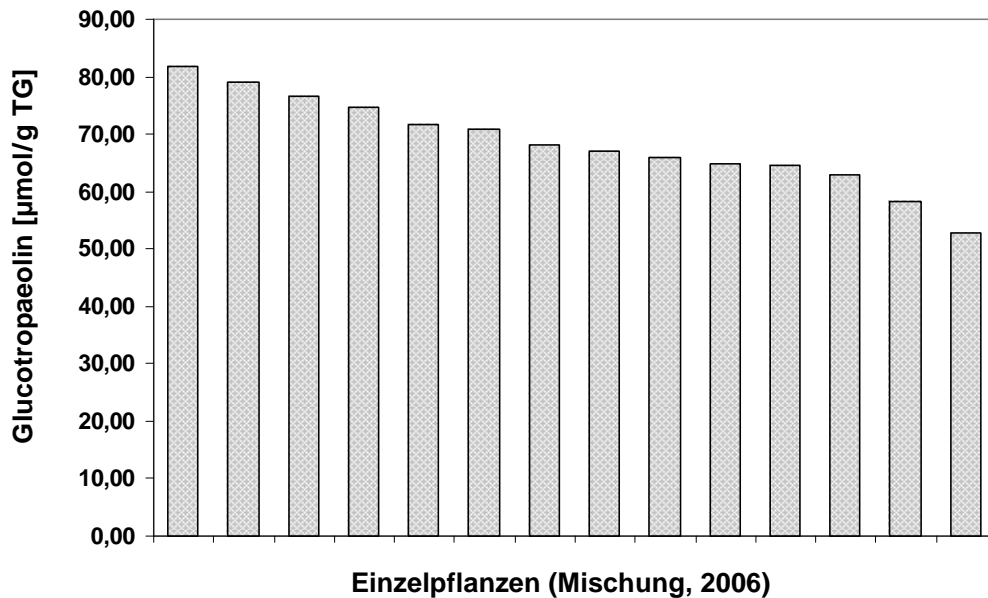


Abbildung 36: Variationsbreite der Glucosinolat-Gehalte der Pflanzen einer Saatgutmischung
(Düngung: +S, Saatabstand: 30 cm, 08.09.2006;
mittlerer Glucosinolat-Gehalt: 68,47 $\mu\text{mol/g}$ TG; Standardabweichung: 1,12 %)

Der mittlere Glucotropaeolin-Gehalt in den Blättern der Pflanzen aus der Saatgutmischung wurde mit 68,5 $\mu\text{mol/g}$ TG ermittelt. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie er auch bei den Pflanzen des *screenings* (Kapitel 4.1.4) und bei Pflanzen einer vergleichbaren Saatgutmischung im Feldanbau auch schon in den Vorjahren bestimmt wurde. Im Jahr 2001 ermittelten Bloem et al. einen maximalen mittleren Glucosinolat-Gehalt von 71,2 $\mu\text{mol/g}$ TG bei Pflanzen dieser Saatgutmischung im Feldanbau. In dieser Versuchsreihe wurde jedoch mit 50 kg N/ha und 25 kg S/ha gedüngt, der Pflanzabstand betrug bei 5 Samen pro Pflanzloch jeweils 60 cm.

4.1.6.1.6 Vergleich der GTL-Gehalte der Regenerate/Saatgutmischung

Von herausragender Bedeutung für die angestrebte pharmazeutische Nutzung ist, dass der mittlere Glucotropaeolin-Gehalt der Regenerate mit 52,2 $\mu\text{mol/g}$ TG um rund 25 % niedriger liegt als in der Saatgutmischung (Abbildung 37, Seite 80). Auch weitere über die gesamte Vegetationszeit hinweg an den Regeneraten durchgeführte Messreihen zeigten, dass die Glucosinolat-Gehalte in den Blättern der Regenerate verhältnismäßig gering sind (FNR-Schlussbericht: Kleinwächter et al., 2007). Selbst wenn das Selektionsverfahren des *screenings* nicht optimal geeignet gewesen sein sollte, alle Pflanzen mit einer genetischen

Prädisposition für hohe Glucosinolat-Gehalte ausfindig zu machen, sollte trotz allem zu erwarten sein, dass die zuvor aus Pflanzen derselben Saatgutmischung selektierten Klone, im Mittel auch vergleichbar hohe Glucosinolat-Gehalte aufweisen. Da die Anbaubedingungen, Witterungsbedingungen und grundprinzipiell auch die genetische Herkunft als Ursachen für die niedrigeren Gehalte ausgeschlossen werden können, fällt es schwer plausible Gründe für diese Erscheinung zu finden.

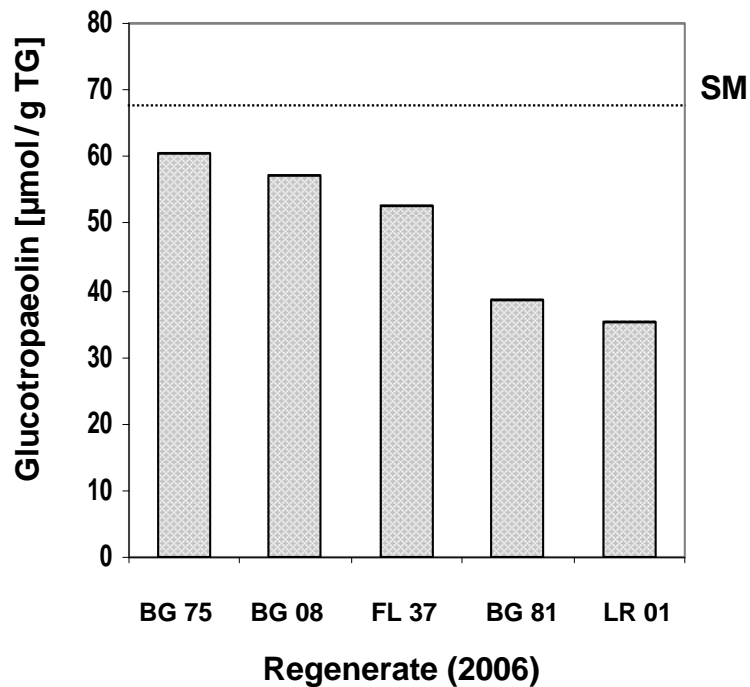


Abbildung 37: Mittlere Glutropaeolin-Gehalte der Regenerate und der Saatgutmischung (SM)
(Düngung: +S, Pflanz- bzw. Saatabstand: 30 cm, 08.09.2006)
Mittlere GTL-Gehalte Regenerate/Saatgutmischung (SM): 52,17 bzw. 68,47 µmol/g TG
(Standardabweichung: 2,63 %)

Möglicherweise nehmen Faktoren, die in Zusammenhang mit der pflanzlichen Entwicklung stehen, Einfluss auf die Höhe der Glutropaeolin-Gehalte in den Blättern der Kapuzinerkresse. Im Verlauf der Entwicklung von Regeneraten und gesäten Pflanzen bestehen zumindest einige Unterschiede. Die Sämlinge durchlaufen im Vergleich zu den Regeneraten eine vollständige pflanzliche Entwicklung, wohingegen die Regenerate als kleine, aber bereits adulte Pflanzen in das Feld ausgebracht werden. So könnten sich an die pflanzliche Entwicklung gekoppelte Einflussgrößen prinzipiell mindernd auf die Glucosinolat-Gehalte in den Regeneraten auswirken. Allerdings lassen sich in den *in vitro*-Pflanzen prinzipiell vergleichbar hohe Glucosinolat-Gehalte wie in den Ursprungspflanzen nachweisen (Abbildung 27, Kapitel 4.1.5.2), so dass ein Einfluss von Entwicklungsfaktoren auf den Glucosinolat-Gehalt in den Regeneraten als eher unwahrscheinlich zu bewerten ist. In der wissenschaftlichen Literatur finden sich bislang keine Studien zu Sekundärstoffgehalten von Regeneraten aus *in vitro*-Pflanzen. Bereits erfolgreich etabliert ist die Massenvermehrung

mittels *in vitro*-Kultur von einer ganzen Reihe kommerziell genutzter Pflanzen, wie z. B. Banane, Papaya, Kaffee und Zuckerrohr (Smith, 1990; Etienne und Berthouly, 2002).

Zusammenfassend kann bezüglich der Einflussgrößen, die sich auf die Höhe der Glucosinolat-Gehalte auswirken, festgehalten werden:

- Auch die genetisch homogenen Klone der Kapuzinerkresse zeigen eine relativ hohe Variationsbreite in den Glucosinolat-Gehalten der Einzelpflanzen. Die mittleren Gehalte dieser Pflanzen variieren um den Faktor 1,6. Sie weisen damit etwas geringere individuelle Unterschiede im Glucosinolat-Gehalt wie die Pflanzen der genetisch heterogenen Saatgutmischung unter denselben Anbaubedingungen auf.
- Dennoch hat die genetische Prädisposition einen wichtigen Einfluss auf die letztendliche Höhe der Glucotropaeolin-Gehalte in den Kapuzinerkressepflanzen, die mittleren Wirkstoffgehalte in den unter identischen Bedingungen kultivierten Varietäten schwanken ebenso um rund 35 %.
- Außerdem nehmen auch äußere Faktoren der unbelebten Umwelt Einfluss auf die Höhe der Glucosinolat-Gehalte in den Kapuzinerkresse-Regeneraten, hierzu zählt die Versorgung mit Wasser und mit Nährstoffen wie Schwefel. Die Auswirkungen von Trockenstress auf die Glucosinolat-Gehalte in der Kapuzinerkresse sind bislang noch nicht näher untersucht wurden, wohingegen der positive Einfluss durch zusätzliche Schwefeldüngergaben bereits seit längerem bekannt ist.

4.1.7 Beurteilung der gewählten Züchtungsstrategie

Die geplante Strategie der Nutzung von Regeneraten aus der *in vitro*-Kultur für den pharmazeutischen Einsatz wird durch diese Ergebnisse grundlegend in Frage gestellt. Der Einsatz von *in vitro*-Regeneraten bietet nach dem derzeitigen Kenntnisstand im Hinblick auf den Glucotropaeolin-Gehalt kaum Vorteile gegenüber dem Einsatz von den bislang verwendeten Saatgutmischungen. Die Wirkstoffgehalte sind in den Regeneraten sogar teilweise niedriger als in den Pflanzen, die aus der Saatgutmischung hervorgegangen sind.

Da auch der Kosten- und Arbeitsaufwand wesentlich höher ist, bringt ein Einsatz zu pharmazeutischen Zwecken kaum Vorteile. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass aus den Klonen der *in vitro*-Kultur Pflanzen resultieren, die in ihrem Wuchs homogen sind. Da die Blätter von Varietäten mit einem besonders kompakten, aufrechten Wuchs wesentlich effektiver zu beernten sind, sollten die Glucotropaeolin-Verluste bei diesen Pflanzen besonders gering ausfallen.

Zudem ist anzumerken, dass der Vergleich der Glucosinolat-Gehalte der Regenerate mit denen der Pflanzen der Saatgutmischung lediglich im Jahr 2006 durchgeführt wurde, und somit nicht auszuschließen ist, dass die gefundenen geringeren Gehalte in den Regeneraten

durch die speziellen Bedingungen dieses Jahres, das heißt z. B. die geringen Niederschläge in der Hauptwachstumsphase (siehe 4.1.6.1.3), bedingt sind.

Um abschließend die eingeschlagene Züchtungsstrategie beurteilen zu können, müssten zum einen die vergleichenden Anbauversuche über mehrere Jahre wiederholt werden, und zum anderen müssten die für die pharmazeutische Nutzung optimierten Ernte- und Nachernteverfahren (z. B. manuelle Ernte mit der Sichel) stärker in den Versuchsablauf integriert werden.

4.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte

Im folgenden Kapitel werden die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum Glucotropaeolin-Gehalt aus pflanzenphysiologischer Sicht beurteilt und ausgewertet. In diesem Zusammenhang kommt dem Transport des Glucotropaeolins in *Tropaeolum* eine besondere Bedeutung zu.

Die bereits in der Einleitung detailliert geschilderte Hypothese zum Transport von Glucotropaeolin wird überprüft. Die zentrale Frage ist, ob der Transport der Glucosinolate in den glucosinolathaltigen Pflanzen in Homologie zum Transport der cyanogenen Glucoside in den cyanogenen Pflanzen über spezielle glycosylierte Transportformen vermittelt wird.

In den cyanogenen Pflanzen werden die cyanogenen Glucoside vor einer Verlagerung über den Apoplasten (z.B. Phloembeladung) glycosyliert. Die resultierenden Diglucoside können durch apoplastisch lokalisierte β -Glucosidasen nicht hydrolysiert werden, so dass eine Passage des Apoplasten und damit die apoplastische Phloembeladung ermöglicht werden.

Zunächst muss geklärt werden, ob analoge Randbedingungen vorliegen. In diesem Zusammenhang muss überprüft werden, ob in *Tropaeolum majus* apoplastische Myrosinasen vorkommen. Das Auftreten apoplastischer Myrosinasen wurde mittels entsprechender Infiltrationsversuche untersucht.

Zudem hat sich das Glucosinolat-Myrosinase-System im Zuge der Evolution aus dem entwicklungsgeschichtlich älteren im Pflanzenreich ubiquitär verbreiteten System der cyanogenen Glucoside und β -Glucosidasen entwickelt, so dass der Transport der Glucosinolate in Form von Diglucosiden auch aus Gründen der Homologie als wahrscheinlich erscheint und die zurzeit weit verbreitete Annahme, dass Glucosinolate als Monoglucoside in den Pflanzen verlagert werden (Chen et al., 2001), grundsätzlich in Frage gestellt werden muss.

4.2.1 Nachweis apoplastischer Myrosinase-Aktivität

Eine bereits seit mehreren Jahrzehnten etablierte und auch ohne spezielle technische Laborausstattung durchführbare Methode zur Isolierung von apoplastischer Flüssigkeit aus Pflanzenmaterialien ist die Infiltrationstechnik (Söding, 1941; Klement, 1965). Einen

Überblick zu verschiedenen Varianten und Applikationen der Infiltrations-Technik, sowie eine kritische Evaluation dieser Methode bietet eine Veröffentlichung von Lohaus und Mitarbeitern (2001).

Für den Nachweis von apoplastischer Myrosinase-Aktivität in den Blättern von *Tropaeolum* wurden die Blätter mit etwa 3 cm an der Spreite verbleibendem Reststängel abgetrennt. Die unverletzten Blattspreiten wurden - ohne dass es zu Kontakten von den Schnittflächen mit der Infiltrationsflüssigkeit (100 mM NaCl) kommt - im Exsikkator unter Vakuum infiltriert (siehe Abbildung 38). Die Blattbereiche in denen die Salzlösung in die substomatären Höhlen vordrang verfärbten sich nach und nach dunkelgrün.

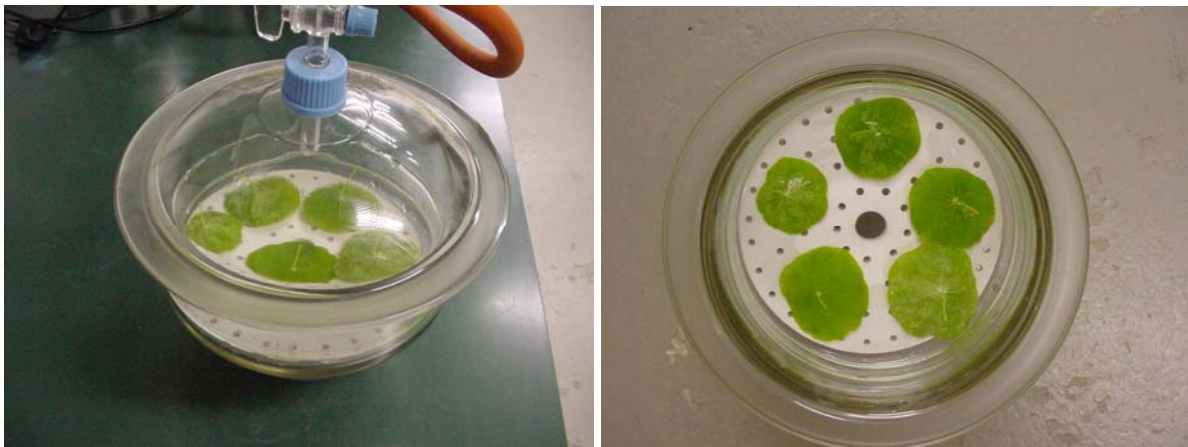


Abbildung 38: Infiltration von Kapuzinerkresseblättern in 100 mM NaCl-Lösung im Exsikkator

Im rechten Bild sind die infiltrierten Gewebebereiche an der dunkelgrünen Verfärbung zu erkennen.

Nach einigen Minuten sollten sich aufgrund der stattfindenden Diffusion hydrophile Bestandteile der Apoplastenflüssigkeit auch im Medium befinden. Das Medium wurde filtriert, eingefroren und das Wasser anschließend mittels Gefriertrocknung entfernt. Das NaCl und die niedermolekularen Bestandteile wurden über eine Gelfiltrationssäule abgetrennt und die Proteinfraction in Puffer überführt. Der auf diese Weise gewonnene Enzymextrakt konnte für die enzymatischen Bestimmungen eingesetzt werden. Weit höhere Ausbeuten lassen sich erzielen, wenn die infiltrierten Lösungen mittels Zentrifugation aus den Blättern entfernt werden (Lohaus et al., 2001). Diese Technik ließ sich allerdings aufgrund der sehr hohen Empfindlichkeit der *Tropaeolum*-Blätter nicht anwenden.

Zum Vergleich wurde aus dem infiltrierten Blattmaterial ein Enzymrohextrakt gewonnen. Die hiervon ermittelten Enzymaktivitäten entstammen neben dem noch im Blatt verbliebenen apoplastischen Enzym vor allem aus dem Symplasten. Von beiden Enzymextrakten wurden sowohl die Myrosinase-Aktivitäten als auch die Malatdehydrogenase-Aktivitäten (MDH) als Marker symplastischer Enzyme bestimmt (Tabelle 5).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Infiltrationsversuche zusammengefasst. In der isolierten Apoplastenflüssigkeit der Kapuzinerkresse konnte tatsächlich eine signifikante Myrosinase-Aktivität nachgewiesen werden, sie betrug rund 0,002 nkat/FG. Dieser Wert entspricht in etwa 1/9.000 der Myrosinase-Aktivität des symplastischen Enzymrohextraktes, für den eine Myrosinase-Aktivität von rund 17,74 nkat/FG ermittelt wurde.

Um zu überprüfen, dass die gemessenen Enzymaktivitäten eindeutig auf aktivierte Myrosinasen beruhen und nicht von anderen ebenfalls im Apoplasten enthaltenen Hydrolasen verursacht werden, wurde ein zweiter Inkubationsansatz mit diesem Enzymextrakt durchgeführt, bei dem aber keine Ascorbinsäure hinzugefügt wurde. In den analysierten Proben ließ sich keinerlei Benzylisothiocyanat nachweisen, so dass die nachgewiesene Enzymaktivität tatsächlich nur auf Myrosinasen zurückzuführen ist.

	Myrosinase-Aktivität [nkat/g FG]	Malatdehydrogenase-Aktivität [nkat/g FG]
apoplast. Infiltrat	0,002	0,004
Enzymrohextrakt	17,74	1010
Verhältnis	ca. 1:9.000	ca. 1:250.000

Tabelle 5: Nachweis von apoplastischer Myrosinase-Aktivität in Infiltrationsflüssigkeit von

Tropaeolum majus (Substrat: Glucotropaeolin)

Malatdehydrogenase-Aktivität (MDH) als Marker cytoplasmatischer Kontamination des Infiltrats (Mittelwerte von Doppelbestimmungen; Standardabweichung Myrosinase- bzw. MDH-Aktivität: 9,41 bzw. 12,86 %)

Da der Anteil der gesamten Malatdehydrogenase-Aktivität im Infiltrat äußerst gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass die pflanzlichen Gewebe während der Infiltration weitestgehend unverletzt erhalten blieben. Die ermittelte Enzymaktivität des apoplastischen Infiltrats betrug etwa 0,004 nkat/g FG und entsprach somit lediglich rund 1/250.000 der Aktivität des symplastischen Enzymrohextraktes.

Die Verhältnisse von apoplastischer zu symplastischer Aktivität der beiden untersuchten Enzyme unterscheiden sich sehr stark. Bei der als ausschließlich symplastisch lokalisiert geltenden Malatdehydrogenase liegt dieses Verhältnis mit 1/250.000 um etwa den Faktor 25 niedriger als das der Myrosinase. Diese Ergebnisse sind ein deutliches Indiz dafür, dass im Apoplasten von *Tropaeolum* Myrosinase vorliegt. Allerdings ist die entsprechende Aktivität im Vergleich zum Symplasten viel geringer; dennoch belegen diese Ergebnisse zweifelsfrei, dass bei Auftreten von Glucotropaeolin im Apoplasten dieses gespalten wird.

In einem weiteren Experiment wurde in der Guttationsflüssigkeit der Kapuzinerkresse ebenfalls eine geringe Myrosinase-Aktivität nachgewiesen. In den entsprechenden Enzymextrakten fanden sich im Mittel etwa 0,0003 nkat/mL. Im Verhältnis zu dieser Aktivität fällt die MDH-Aktivität mit 0,012 nkat/mL allerdings hoch aus, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Blätter von denen die Guttationsflüssigkeit gesammelt

wurde leichte Verletzungen aufwiesen, die sicherlich dazu führten, dass zusätzlich symplastische Enzyme in die Guttationsflüssigkeit gelangten.

In der wissenschaftlichen Literatur findet sich bislang lediglich ein Hinweis auf eine apoplastische Lokalisierung von Myrosinase. In Feinschnitten von Stängeln des Rapses (*Brassica napus*) konnten mittels monoklonaler Antikörper gegen Myrosinase neben Myrosinzellen im Grundgewebe auch Xylemzellen detektiert werden, die dieses Enzym enthalten (Höglund et al., 1991). Da die Xylemzellen Teil des apoplastischen Kontinuums sind, dürften auch in anderen Bereichen des Apoplasten Myrosinase und somit auch gewisse Myrosinase-Aktivitäten auftreten.

Da im Apoplasten verschiedener anderer Pflanzen bereits Ascorbinsäure nachgewiesen worden ist (Polle und Rennenberg, 1993; Turcsányi et al., 2000), ist es sehr wahrscheinlich, dass die im Apoplasten von *Tropaeolum* enthaltene Myrosinase in der aktivierten Form vorliegt. Es ist schon seit längerem bekannt, dass die antioxidativ wirkende Ascorbinsäure zusammen mit ihrer reduzierten Form, der Dehydroascorbinsäure, eine wichtige Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress z. B. durch Ozon (O₃) inne hat.

Bei Infiltrationsversuchen mit *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), *Oryza sativa* (Reis) und *Triticum aestivum* (Weizen) wurden eine ganze Reihe funktionaler Proteine des Apoplasten anhand ihrer Aminosäuresequenzen identifiziert (Haslam et al., 2003). Ein Großteil dieser Proteine sind Teil der pflanzlichen Abwehr gegen mikrobielle Pathogene (z. B. Glucanase, Thaumatinase und Chitinase), spielen eine Rolle im Zellwachstum (ebenfalls Chitinase, Ascorbatoxidase und verschiedene Glucohydrolasen, wie β -Glucosidasen), übernehmen Funktionen in der Signaltransduktion (Serin/Threonin-Kinasen und Serin-Carboxypeptidasen), Nährstoffaufnahme (Nitratreduktase) oder der Abwehr von oxidativem Stress (z. B. Peroxidasen). In Anbetracht der Tatsache, dass im pflanzlichen Apoplasten viele für die Abwehr von mikrobiellen Pathogenen relevante Proteine lokalisiert sind, erscheint es wenig überraschend, dass sich sowohl in der Infiltrationsflüssigkeit als auch in der Guttationsflüssigkeit von *Tropaeolum* Myrosinase anhand ihrer Aktivität nachweisen lässt.

Für den Transport des Glucotropaeolins in der Kapuzinerkresse bedeuten die vorgestellten Daten allerdings, dass im Zuge der Passage des Apoplasten, z.B. bei der Phloembeladung, aktive Myrosinase vorliegen, die das Glucotropaeolin spalten würden. Entsprechend der bereits vorgestellten Hypothese (siehe Kapitel 1.2.) könnten für das Beladen des Phloems mit Glucosinolaten spezielle nicht durch Myrosinase hydrolysierbare Transportformen, wie Diglucoside, genutzt werden. Nach Aufnahme in das Phloem würde die anschließende Verlagerung ebenfalls als Diglucosid oder aber nach Abspalten der terminalen Glucose auch als ursprüngliches „Monoglucosid“ Glucotropaeolin erfolgen. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, dass der komplette Ausschluss von Myrosinase aus den Bereichen der Beladung im Apoplasten und aus den Leitbündelbereichen durch eine stringente Lokalisierung sichergestellt wird.

4.2.2 Suche nach Glucotropaeolin-Glucosiden in *Tropaeolum*

Für die gezielte Suche nach den vermeintlichen Transportformen des Glucotropaeolins in der Kapuzinerkresse wurde eine „electrospray ionization“ (esi)-LC/MS-Anlage am Institut für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig genutzt. In einem ersten Lauf mit einem Glucotropaeolin-Standard konnte das Glucotropaeolin-Anion in der Massenspektroskopie verlässlich anhand seines Molekulargewichts (Mr) von 408,4 g/mol identifiziert werden.

Sollte Glucotropaeolin in der Kapuzinerkresse - analog zu cyanogenen Glucosiden - als Diglucosid verlagert werden, dann sollte sich in geeigneten Extrakten mit der esi-LC/MS auch das Glucotropaeolin-Glucosid-Anion mit einem Molekulargewicht von 570,6 g/mol nachweisen lassen ($408,4 \text{ g/mol (Glucotropaeolin-Anion)} + 180,16 \text{ g/mol (Glucose)} - 18 \text{ g/mol (H}_2\text{O)} = 570,56 \text{ g/mol (Glucotropaeolin-Glucosid)}$).

Im Zuge der durchgeführten Messungen wurden zum einen Extrakte von pflanzlichen Organen wie Blätter, Samen und Stängel untersucht. Zum anderen wurde aber ganz besonderes Augenmerk auf pflanzliche Exsudate wie Guttationsflüssigkeit und Nektar gerichtet, weil in diesen die Wahrscheinlichkeit Transportmetabolite vorzufinden besonders hoch ist. In einem weiteren Experiment wurden Blätter der Kapuzinerkresse infiltriert und ein Extrakt der isolierten Apoplastenflüssigkeit analysiert.

Guttationsflüssigkeit entstammt dem Xylem, das innerhalb der Leitbündel in großer räumlicher Nähe zum Phloem steht. Bei Guttation werden große Mengen von Xylemflüssigkeit durch den entsprechenden apoplastischen Raum gespült. Dadurch werden auch Metabolite, die im Zuge einer (apoplastischen) Phloembeladung den angrenzenden apoplastischen Bereich des Phloems passieren mit ausgespült. Dadurch finden sich die entsprechenden Metabolite, die eigentlich im Phloem transportiert werden, auch in der Xylemflüssigkeit, bzw. in der Guttationsflüssigkeit.

Basierend auf diesen Zusammenhängen ist es im Fall des Dhurrin-Transportes gelungen, dass Dhurrin-Glucosid in Guttationsflüssigkeiten von *Sorghum bicolor* nachzuweisen (Selmar et al., 1996). Weitere Möglichkeiten, die Zusammensetzung von Phloemflüssigkeit zu analysieren, bestehen in der Analyse von Exsudationstropfen, die über die Aphidentechnik gewonnen werden (Fisher und Frame, 1984), oder über die Untersuchung von Nektar, da Nektar eine nahezu identische Zusammensetzung wie Phloemsaft hat (De la Barrera und Nobel, 2004; Adler, 2000).

4.2.2.1 Analysen der Guttationsflüssigkeit

Im Fall der passiven, epithemalen Guttation, die im Pflanzenreich am weitesten verbreitet ist und auch bei der Kapuzinerkresse auftritt, scheiden die Pflanzen durch den Wurzeldruck getrieben überschüssiges Wasser über die Hydathoden aus (Abbildung 39). Dieser Fall tritt dann ein, wenn die Außenluft so stark mit Wasserdampf gesättigt ist, dass die Transpiration über die Stomata geringer ist, als die durch den Wurzeldruck in die Blätter verlagerte

Wassermenge. Die Hydathoden dienen speziell der Abscheidung dieses überschüssigen Wassers aus dem Xylem und verhindern das Überfluten der für den Gasaustausch essentiell wichtigen stomatären Interzellularsysteme. Aus diesem Grund findet Guttation fast ausschließlich in den frühen Morgenstunden statt.



Abbildung 39: Guttierende Blätter der Kapuzinerkresse

Die Hydathoden der Kapuzinerkresse sind am Blattrand sowie entlang der Blattadern auf der Blattober- und Blattunterseite lokalisiert.

Im September des Jahres 2005 wurde an mehreren Tagen zur Zeit der Morgendämmerung von den Kapuzinerkressepflanzen auf dem Versuchsfeld der FAL (Braunschweig) Guttationsflüssigkeit von den Blättern abgestreift, in Plastikschalen gesammelt und direkt in Stickstoff schockgefroren, um zu verhindern, dass die Glucoside durch Hydrolysen degradiert werden. Im Anschluss wurde das Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt. Für die HPLC/MS-Analysen wurden aus der verbleibenden Trockensubstanz methanolische Extrakte erstellt. Allein im Herbst 2005 wurden rund 6 Liter Guttationsflüssigkeit gesammelt und aufgearbeitet, im Herbst des Jahres 2006 folgten noch einmal weitere 10 Liter.

Die ersten Analysen an der LC/MS wurden unter den Chromatographie-Bedingungen der Standard-Glucotropaeolin-Analytik durchgeführt (methanolhaltiges Fließmittelgemisch; 40 mM NH_4Ac ; rp 18-Säule). Extrakte aus Guttationsflüssigkeit bzw. Blattmaterial wurden nach HPLC-Trennung massenspektrometrisch gezielt auf das Vorhandensein von Substanzpeaks mit einem Molekulargewicht von 570 g/mol untersucht.

Eine der Hauptkomponenten in der Guttationsflüssigkeit der Kapuzinerkresse ist das Glucosinolat Glucotropaeolin (siehe Abbildung 40, Seite 88). In dem gezeigten Ausschnitt des LC/MS-Chromatogramms ist dessen Peak ($M_r=408,1$ g/mol; $R_T=16,4$ min) deutlich zu erkennen.

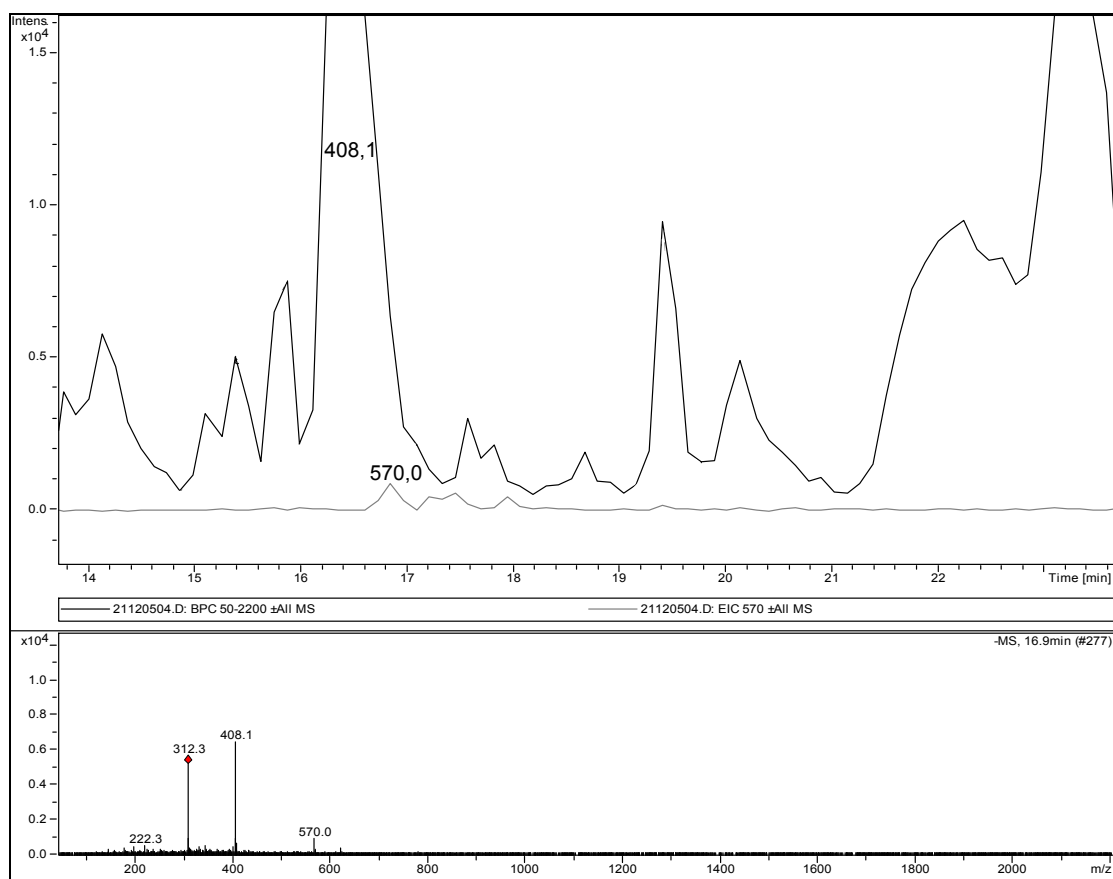


Abbildung 40: Ausschnitt aus dem LC/MS-Chromatogramm eines Extraktes der Guttationsflüssigkeit von *Tropaeolum*

(entspricht etwa 4,6 mL Guttationsflüssigkeit/Injektion)

Unter Verwendung des Standard-Fließmittels ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$; 94/6; 40 mM NH_4Ac) aus der Glucotropaeolin-Analytik liegen Peaks putativer Diglucoside ($M_r=570,0$ g/mol) im Bereich des „tailings“ des Glucotropaeolin-Peaks ($M_r=408,4$ g/mol).

Mehrere Analysen von Extrakten aus der Guttationsflüssigkeit mit der analytischen HPLC des *screenings* ergaben, dass die Guttationsflüssigkeit der Kapuzinerkresse eine Glucotropaeolin-Konzentration von etwa 2 μM aufweist. Die ökologische Relevanz apoplasmatischer Glucosinolate und Myrosinasen, sowie die daraus resultierende permanente Freisetzung von Senfölen, werden ausführlich im Kapitel 4.2.5 diskutiert.

In dem Extrakt ließen sich aber auch vier sehr kleine, knapp über der Nachweisgrenze liegende, Substanzpeaks mit dem gesuchten Molekulargewicht von 570 g/mol nachweisen. Die Retentionszeiten (RT) dieser Peaks liegen bei 16,9, 17,1, 17,3 und knapp 18 min. Somit werden die Peaks der putativen Glucotropaeolin-Glucoside vollständig von dem wesentlich größeren Peak des Glucotropaeolins ($M_r=408,1$ g/mol) überdeckt. Sie liegen im Bereich des so genannten „tailings“ dieses Peaks.

Da es sich um vier einzelne voneinander unterscheidbare Peaks handelt, denen Substanzen mit einer Masse von $M_r=570$ g/mol zugrunde liegen, stellt sich die Frage, ob es sich bei den

Peaks um strukturelle Isomere des Glucotropaeolin-Glucosids handeln könnte. In Frage kämen unterschiedliche Hexosen als Bindungspartner des Glucotropaeolins, wie Glucose, Mannose oder Galactose oder aber auch unterschiedliche Glycosilierungsmuster am Grundgerüst des Glucotropaeolins. Dieser Frage soll in weiteren Analysen mit Techniken zur Strukturaufklärung, wie z.B. der Kernresonanzspektroskopie auf den Grund gegangen werden.

Im weiteren Verlauf dieser Messreihen wurden auch andere Pflanzenorgane, wie Samen und Stängel, analysiert. Dabei waren die Verhältnisse der Flächen des Glucotropaeolin-Peaks zu denen der putativen Diglucoside stets kleiner als in der Guttationsflüssigkeit. Deshalb wurden für die folgenden Arbeiten zur Isolierung der putativen Glucotropaeolin-Glucoside ausschließlich Extrakte aus der Guttationsflüssigkeit verwendet.

Zunächst wurde versucht eine HPLC-Methode zur Isolierung der putativen Diglucoside zu entwickeln. Hierbei steht im Vordergrund eine Kombination aus Säulenmaterial und Fließmittel zu finden, mit der die putativen Glucotropaeolin-Glucoside vom Glucotropaeolin oder anderen Substanzen getrennt werden, so dass durch Fraktionierung die den Peaks zugrunde liegenden Reinsubstanzen isoliert und weiter aufgereinigt werden können.

Aus Arbeiten mit cyanogenen Glucosiden/Diglucosiden war bekannt, dass sich bei einem Wechsel von einem methanolhaltigen zu einem tetrahydrofuranhaltigen Fließmittel (Tetrahydrofuran=THF) unter Beibehaltung der stationären RP18-Phase die Reihenfolge der Elution von Monoglucosiden und deren Diglucoside umkehren kann (Selmar et al., 1996). Um zu überprüfen, ob sich unter Verwendung eines tetrahydrofuranhaltigen Fließmittels die Elutionszeiten von Glucotropaeolin und seinen putativen Diglucosiden verschieben und eine Trennung der Peaks möglich wird, wurden entsprechende tetrahydrofuranhaltige Fließmittel erprobt. Für den Glucotropaeolin-Standard erwies sich ein Fließmittel-Gemisch aus Wasser und Tetrahydrofuran (97/3; v/v; 40 mM NH₄Ac) als besonders gut geeignet, das Glucotropaeolin eluierte nach 7,5 min.

An der esi-LC/MS wurde anschließend an einem um den Faktor 6 aufkonzentrierten Extrakt aus der Guttationsflüssigkeit überprüft, wie die putativen Diglucoside unter den veränderten HPLC-Bedingungen retardieren.

Der Austausch von Methanol durch THF im Fließmittel ermöglicht tatsächlich die Auftrennung von Glucotropaeolin von drei der vier Peaks mit der gesuchten Masse $M_r=570$ g/mol (Abbildung 41).

Das Glucotropaeolin eluierte nach etwa 7,5 min. Zwei Peaks mit der Masse des putativen Diglucosids wurden als getrennte Peaks nach rund 6,5 und 6,8 min kurz vor dem Glucotropaeolin detektiert. Der dritte relativ kleine Peak liegt mit einer Retentionszeit $RT=7,4$ min schon im Elutionsbereich des Glucotropaeolins und ist somit auch unter den veränderten Fließmittel-Bedingungen nicht eindeutig vom Glucotropaeolin trennbar. Der

vierte Substanzpeak mit der gesuchten Masse von 570 g/mol eluiert 2,5 min später als das Glucotropaeolin nach 9,9 min.

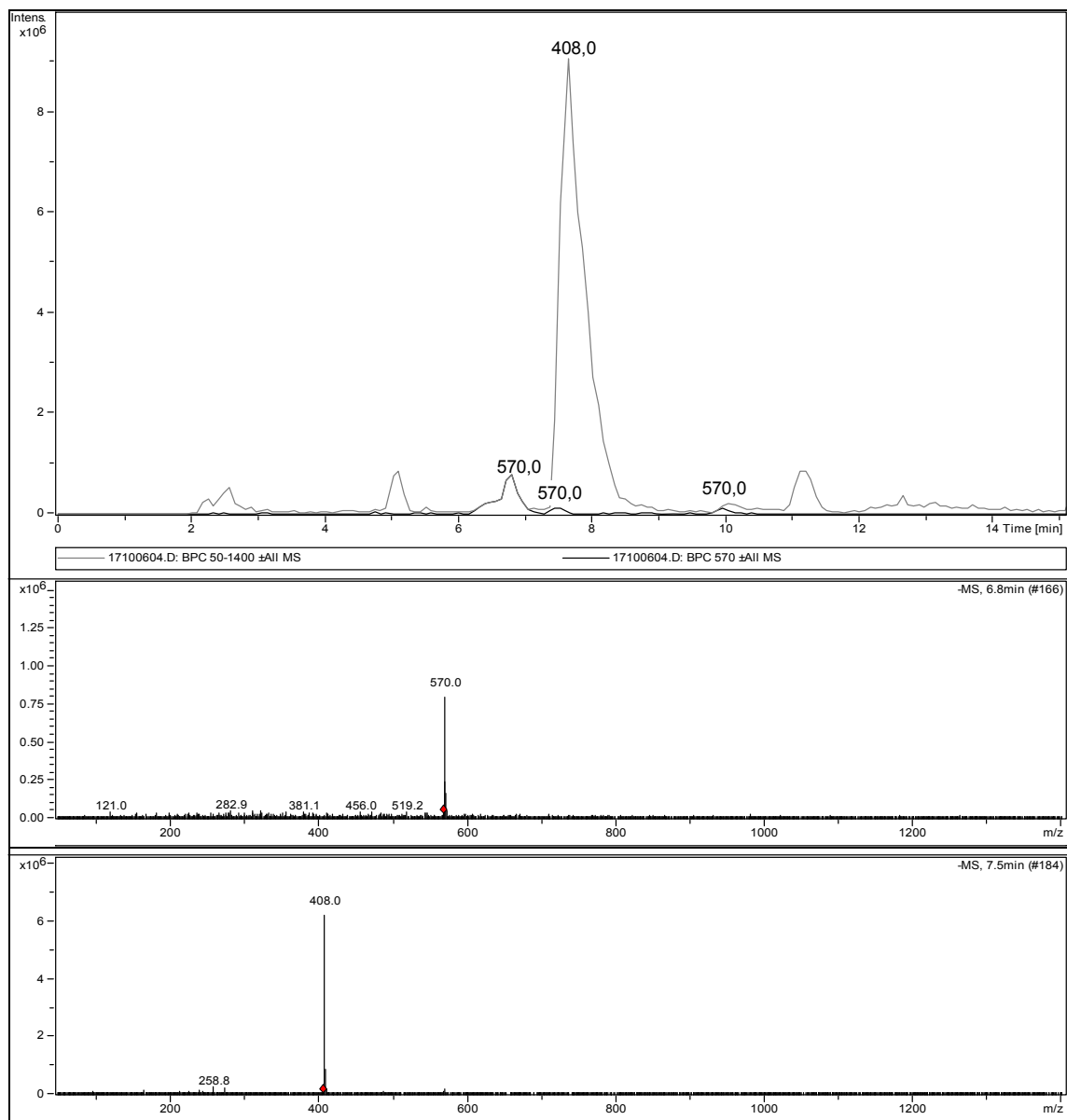


Abbildung 41: LC/MS-Chromatogramm eines um den Faktor 6 aufkonzentrierten Extraktes der Guttationsflüssigkeit von *Tropaeolum*

(entspricht 27,6 mL Guttationsflüssigkeit /Injektion)

Der Wechsel von einem methanolhaltigen Fließmittel zu einem tetrahydrofuranhaltigen Fließmittel (H₂O/THF; 97/3; 40 mM NH₄Ac) ermöglicht die Auftrennung von putativen Glucotropaeolin-Glucosiden (Mr=570,0 g/mol) und Glucotropaeolin (Mr=408,0 g/mol) mittels einer RP18-Säule.

Die Peakfläche des Glucotropaeolin-Peaks beträgt 244.000.000 Flächeneinheiten, die des Hauptpeaks mit der Masse Mr=570 g/mol (RT=6,8 min; Abbildung 41) wurde mit 17.000.000 Flächeneinheiten bestimmt. Somit liegt das Verhältnis der Flächeneinheiten dieser beiden Peaks (putatives Diglucosid/Glucotropaeolin) bei rund 1:14.

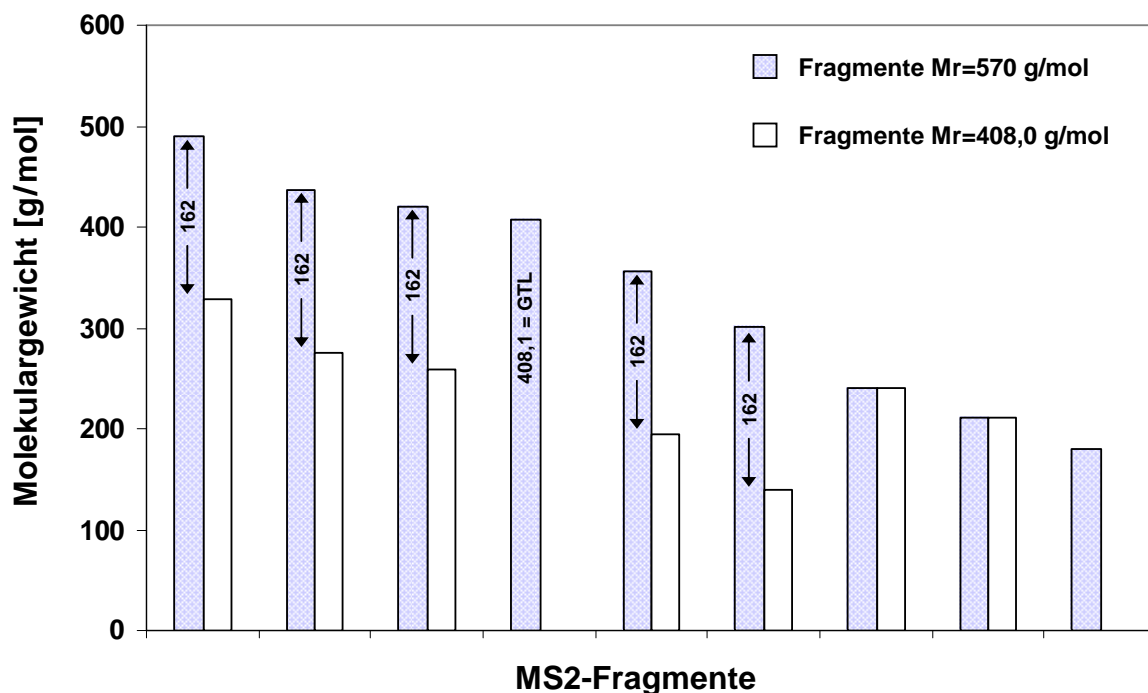


Abbildung 42: Bezug zwischen MS/MS-Fragmenten des putativen Diglucosids (Mr=570 g/mol; RT=6,8 min) zu denen des Glucotropaeolins (Mr=408,0 g/mol; RT=7,5min)
MS2-Fragmente sortiert nach Molekulargewicht der Fragmente des putativen Diglucosids, zum Vergleich sind die hierzu entsprechenden Bruchstücke des Glucotropaeolins aufgeführt.

Ein Vergleich der MS/MS-Fragmente des putativen Diglucosids mit denen des Glucotropaeolins zeigt eindeutig, dass es sich bei dem unbekannten Molekül mit der Masse Mr=570 g/mol um ein Derivat des Glucotropaeolins handeln muss (Abbildung 42):

Ein Bruchstück des Moleküls mit der Masse Mr=570 g/mol ist das Glucotropaeolin selbst (Mr=408,1 g/mol). Zwei der MS2-Fragmente von Glucotropaeolin und putativem Diglucosid sind miteinander identisch, sie werden bei der Fragmentierung der beiden Moleküle gebildet. Zudem lassen sich von fünf der neun mengenmäßig relevanten Unterfragmente des putativen Diglucosids entsprechende Bruchstücke der Glucotropaeolin-Moleküle nachweisen, deren Differenz in der Masse jeweils 162 g/mol beträgt.

Diese Ergebnisse zeigen anschaulich, dass es sich bei der strukturell nicht eindeutig bekannten Verbindung mit dem gesuchten Molekulargewicht von Mr=570 g/mol in der Grundstruktur um ein Glucotropaeolin-Molekül handeln sollte, das um eine zusammenhängende Struktureinheit mit einem Molekulargewicht von 162 g/mol erweitert ist. Aus den esi-LC/MS Daten lassen sich jedoch keine Rückschlüsse darauf ziehen, um welche Moleküleinheit es sich handelt, oder an welcher Stelle diese an die Glucotropaeolin-Grundstruktur gebunden ist.

Es bleibt festzuhalten, dass durch eine Kondensationsreaktion mit Hexosen, wie z. B. Glucose, Mannose oder Galactose, eine Erhöhung des Molekulargewichts des Glucotropaeolin-Moleküls um genau 162 g/mol resultieren würde.

Für die noch ausstehenden weitergehenden Strukturanalysen werden jedoch zunächst noch größere Mengen der putativen Diglucoside benötigt, die aus geeigneten Extrakten isoliert werden müssen. Für eine Kernresonanzspektroskopie (HNMR) wird allgemeinhin 1 mg der isolierten Reinsubstanz benötigt. Sollte sich das Peakflächen-Verhältnis (putatives Diglucosid/Glucotropaeolin) von 1:14 auch auf die Konzentrationen übertragen lassen, dann müssten bei einer mittleren Glucotropaeolin-Konzentration von 2 μM rund 12 Liter Guttationsflüssigkeit aufgearbeitet werden um etwa 1 mg (entspricht 1,754 μmol) der Hauptkomponente mit einem Molekulargewicht $M_r=570$ g/mol isolieren zu können, dabei sind etwaige Verluste bei der Aufreinigung noch nicht mit einkalkuliert.

4.2.2.2 Analysen von Nektar

In Anbetracht des enormen Arbeitsaufwandes, der für die Isolierung von 1 mg Reinsubstanz eines putativen Diglucosids aus etwa 12 L Guttationsflüssigkeit per HPLC erforderlich ist, wurde geprüft, ob andere Quellen zur Isolierung dieser Metabolite genutzt werden könnten. Von besonderem Interesse sind hier in erster Linie die Extrakte, die ein wesentlich besseres Verhältnis von putativem Diglucosid/Glucotropaeolin aufweisen, so dass keine zu großen Mengen an Glucotropaeolin die HPLC-Säulen überladen, bzw. die Mengen an einsetzbarem Extrakt pro Aufreinigung stark reduziert werden müssten. Ein hydrolytischer Abbau des vorhandenen Glucotropaeolins mit Myrosinase wurde nicht in Erwägung gezogen, da nicht ausreichend sichergestellt werden konnte, dass die Diglucoside nicht vom eingesetzten Enzympräparat gespalten werden. Entsprechend der dargelegten Hypothese von diglucosidischen Transportmetaboliten sollte die Myrosinase zwar keine Glucotropaeolin-Glucoside spalten, doch da keine hochaufgereinigten Myrosinase-Fraktionen zur Verfügung stehen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass in den entsprechenden Enzymextrakten ebenfalls Diglucosidasen vorkommen.

Pflanzlicher Nektar stellt in dieser Hinsicht ein äußerst interessantes Versuchsobjekt dar, denn es handelt sich um pflanzliche Exsudate, die von speziellen Drüsen, den Nektarien, direkt aus dem Phloem nach außen abgegeben werden; dabei ist die stoffliche Zusammensetzung des Nektars sehr ähnlich der des Phloemsafes (De la Barrera und Nobel, 2004; Adler, 2000). Es ist anzunehmen, dass die Abgabe von nahrhaftem Nektar der Anlockung von bestäubenden oder anderweitig in symbiotischer Beziehung zu den Pflanzen stehenden Insekten dient (De la Barrera und Nobel, 2004).

Geht man davon aus, dass in der Pflanze Verlagerungen von Metaboliten über das Phloem stattfinden, dann ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass - ähnlich wie bei der

Guttationsflüssigkeit - sich auch im Nektar entsprechende Transportmetabolite widerfinden lassen.

In den Blüten der Kapuzinerkresse befinden sich die Nektarien am Grunde des Blütensporns. Für die Ernte des viskosen Nektars wurden Pipettenspitzen mit einem ca. 2 cm langen Stück eines Silikonschlauchs versehen (Abbildung 43). Der Nektar wurde in 50 μL Wasser gelöst und mit dem „Saugrüssel“ abgesaugt. Der so geerntete Nektar wurde noch direkt auf dem Versuchsfeld in Stickstoff schockgefroren, um sicherzustellen, dass die Glucoside nicht hydrolysiert werden. In den Blütenspornen der Kapuzinerkresse wurde als Durchschnittsmenge von über 2000 Blüten 2,7 mg Nektar pro Blüte geerntet. Der Nektar wurde zunächst methanolisch extrahiert und zentrifugiert, um die enthaltenen Enzyme zu denaturieren und abzutrennen. Anschließend wurde der Extrakt in HPLC-Fließmittel überführt und über einen Filterspritzenaufsatz sterilfiltriert (0,2 μm).



Abbildung 43: Pipettenspitzen mit „Saugrüssel“ aus Silikonschlauch zum Ernten des Nektars

Der Nektar wurde in 50 μL Wasser gelöst und vorsichtig aus dem Sporn heraus gesaugt.

Ein Aliquot des so aufgereinigten Nektars, das etwa der in 2 Blüten enthaltenden Menge entspricht, wurde mit der HPLC/MS unter den für die Glucotropaeolin-Glucoside optimierten HPLC-Bedingungen untersucht (Fließmittel: $\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$; 97/3; 40 mM NH_4Ac). Auch in diesen Proben ließen sich Glucotropaeolin ($\text{Mr}=408$ g/mol; $\text{RT}=7,9$ min) und dessen putatives Diglucosid ($\text{Mr}=570$ g/mol; $\text{RT}=6,5$ min) nachweisen (Abbildung 44).

Ein ganz wesentlicher Unterschied in der Chromatographie der Extrakte des Nektars zu der der Guttationsflüssigkeit besteht darin, dass die drei Peaks mit der gesuchten Masse von $\text{Mr}=570$ g/mol von einem Saccharose-Schlier ($\text{Mr}=340$ g/mol) des zuckerreichen Nektars überdeckt werden. Für das putative Diglucosid wurde eine Peakfläche 16.500.000 Flächeneinheiten ermittelt, für das Glucotropaeolin liegt dieser Wert bei 135.900.000. Somit weist der Nektar mit 1:8 das günstigste Peakflächen-Verhältnis (putatives

DiglucoSID/Glucotropaeolin) auf und erscheint somit für eine Isolierung und Aufreinigung des Glucotropaeolin-Derivats mittels HPLC als besonders gut geeignet.

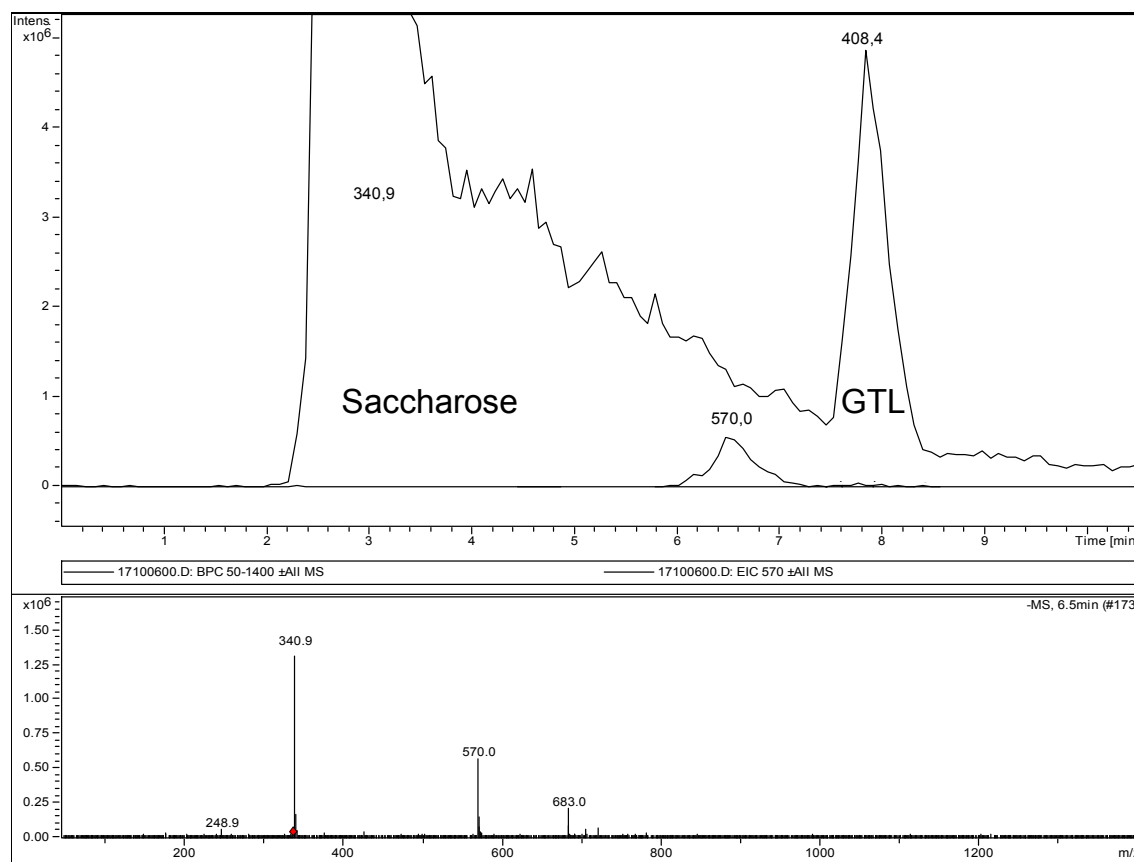


Abbildung 44: LC/MS-Chromatogramm eines Extraktes aus dem Nektar der Kapuzinerkresse

Die injizierte Menge entspricht dem Nektar von 2 Blüten oder ca. 5,5 mg Nektar.

(Fließmittel: H₂O/THF; 97/3; 40 mM NH₄Ac; Säulenmaterial: rp18)

Im Nektar von lediglich 2 Blüten ist eine ebenso große Menge des putativen Glucotropaeolin-Glucosids enthalten wie etwa in 30 mL Guttationsflüssigkeit (Abbildung 41 Kapitel 4.2.2.2). Legt man die Kalkulation des vorherigen Kapitels zugrunde, sollte anstatt der rund 12 Liter Guttationsflüssigkeit, die zur Isolierung von 1 mg der Hauptkomponente mit einer Masse von $M_r=570$ g/mol ausreichen müssten, lediglich der Nektar von etwa 900 Blüten notwendig sein.

Für die Isolierung des putativen DiglucoSIDs müssen jedoch noch geeignete Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen die Saccharose von den Extrakten des Nektars abzutrennen. Wie in Abbildung 44 zu sehen ist, überlagert die Saccharose die zu isolierenden Peaks, so dass eine direkte Aufreinigung aus dem Extrakt nicht ohne weiteres möglich ist. Denkbar wäre es zu diesem Zweck eine Vorreinigung in Form einer Festphasenextraktion mit stark hydrophoben Säulenmaterialien, wie z. B. Sep-pak[®]-C₁₈, durchzuführen. Bei einer geeigneten Kombination von Wasch- und Elutionsmitteln könnte die sehr hydrophile Saccharose unverzüglich von der Säule gewaschen werden, wohingegen die hydrophoberen.

Diglucoside des Glucotropaeolins aufgrund ihres Benzylrestes von dem hydrophoben Adsorbens retardiert werden sollten.

4.2.2.3 Analysen der apoplastischen Waschflüssigkeiten

Der Arbeitshypothese folgend, dass in den glucosinolathaltigen Pflanzen Glucosinolat-Glucoside vorkommen, die vor den Hydrolysen durch apoplastische Myrosinasen geschützt sind und bei der Beladung des Phloems den Apoplasten passieren, müssten sich in isolierten Apoplastenflüssigkeiten ebenfalls die entsprechenden Transportmetabolite mit Hilfe der Massenspektroskopie nachweisen lassen. Aus einem Teil des gefriergetrockneten apoplastischen Infiltrats aus den Blättern der Kapuzinerkresse (siehe 4.2.1) wurde in Ergänzung zu den Enzyminkubationen ein methanolischer Extrakt erstellt, der alle niedermolekularen Glucoside enthalten sollte.

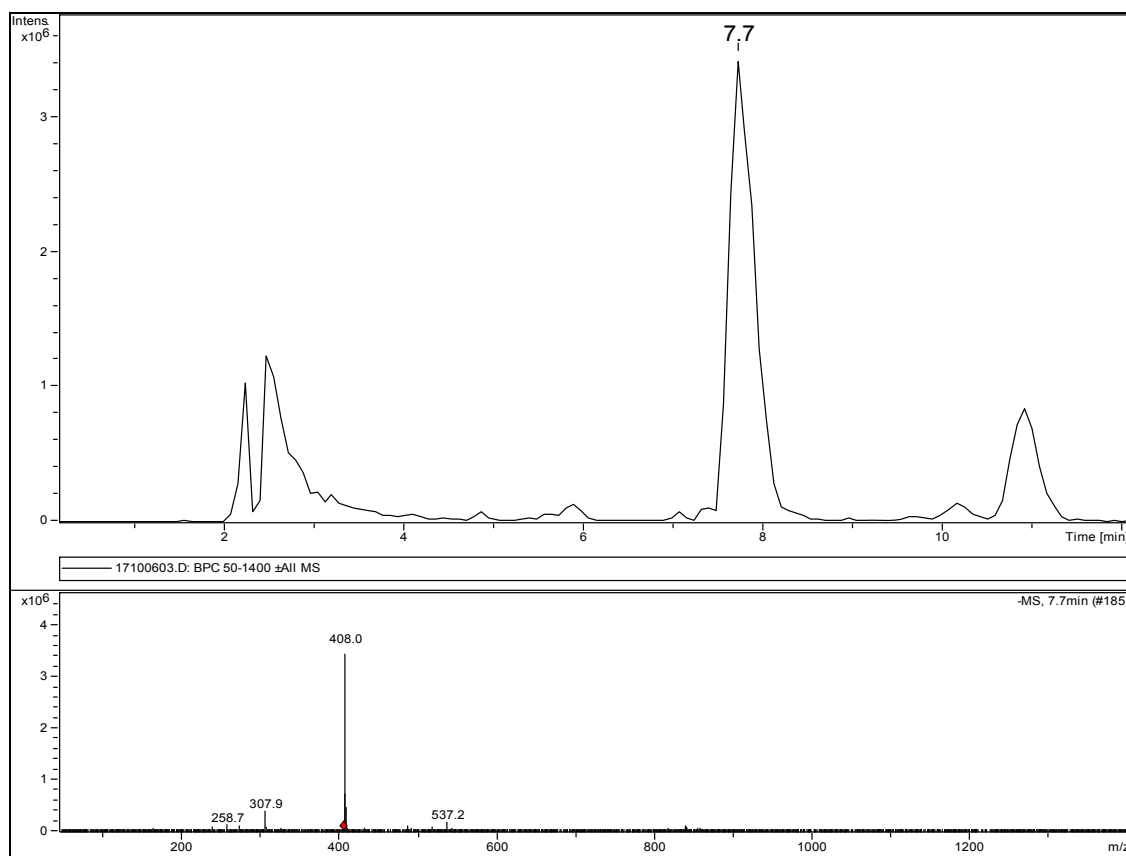


Abbildung 45: LC/MS-Chromatogramm der Glucosid-Fraktion eines Infiltrats der Blätter der Kapuzinerkresse

In diesem Extrakt finden sich große Mengen an Glucotropaeolin (RT=7,7 min), jedoch ließen sich die potentielle Diglucoside (Mr=570 g/mol) nicht nachweisen.

Die HPLC/MS-Analysen ergaben, dass in der isolierten Apoplastenflüssigkeit lediglich das Monoglucosid Glucotropaeolin (RT=7,7 min; Mr=408,0 g/mol) enthalten ist, wohingegen Substanzen mit dem Molekulargewicht der putativen Diglucoside (Mr=570,0 g/mol) nicht

nachweisbar waren (Abbildung 45). Offensichtlich wurden in den untersuchten Blättern keine Glucotropaeolin-Glucoside in den Apoplasten abgegeben, so dass vermutlich kein Glucotropaeolin aus diesen Blättern abtransportiert wurde, oder aber dass die vorhandenen Diglucoside während der Infiltration von Diglucosidasen gespalten wurden.

Besonders auffällig erscheint die relativ große Menge an Glucotropaeolin, die mit dem Infiltrat aus dem Apoplasten der Kapuzinerkresseblätter isoliert wurde. Gehaltsbestimmungen mit der HPLC ergaben, dass aus rund 14 g Blättern (FG) ungefähr 400 nmol Glucotropaeolin durch die Infiltration isoliert worden sind, und das obwohl die Blattgewebe so gut wie unverletzt blieben, wie die parallele Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität in der Proteinfraction eindeutig offenbarte. Geht man davon aus, dass das Trockengewicht der Kapuzinerkresseblätter rund 1/10 des Frischgewichts beträgt und der mittlere Glucosinolat-Gehalt im Trockengewicht bei rund 50 $\mu\text{mol/g}$ TG lag (Durchschnittswert des Jahres 2005, siehe 4.1.4), dann macht eine Menge von 400 nmol rund 0,5 % der gesamten in den Blättern enthaltenen Menge an Glucotropaeolin aus.

Die ökologische Relevanz apoplastischer Glucosinolate und Myrosinasen, sowie die daraus resultierende permanente Freisetzung von Senfölen, werden ausführlich im übernächsten Kapitel (4.2.5) diskutiert.

4.2.4 Glucotropaeolin-Glucoside - eine neue „alte“ Transportform?

Bislang galt das Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat) als das einzige Glucosinolat in der Kapuzinerkresse. Mit dieser Arbeit wird erstmals die Existenz von Derivaten des Glucotropaeolins in der Kapuzinerkresse beschrieben. Wie die Vergleiche der mit der esi-LC/MS aufgenommenen Fragmentierungsmuster des Glucotropaeolins und des putativen Diglucosids ($M_r=570$ g/mol) unzweifelhaft belegen, handelt es sich eindeutig um Derivate des Glucotropaeolins.

Diese strukturell noch nicht näher identifizierten Derivate des Glucotropaeolins sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Glucoside des Glucotropaeolins, da das Molekulargewicht der Derivate genau um die Masse eines Glycosylrestes (Furanosylrest: $M_r=162$ g/mol) erhöht ist. Bis *dato* gelang es allerdings nicht, die den Glycosylresten zugrunde liegenden Strukturen der Zucker zu identifizieren. Als potentielle Bindungspartner kommen die besonders häufig in Pflanzen vorkommenden Hexosen, wie d-Glucose, d-Mannose und d-Galactose, in Frage. Außerdem bedürfen auch die Glycosilierungsmuster noch der näheren Klärung mit geeigneten Methoden zur Strukturaufklärung. Hierzu scheint die Kernresonanzspektroskopie (HNMR) sehr Erfolg versprechend, ermöglicht sie doch sowohl die Identifikation der den Substanzen zugrunde liegenden Strukturen als auch deren Konfigurationen.

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich bislang so gut wie keine konkreten Informationen zu Glucosinolat-Glucosiden; lediglich in einer Veröffentlichung werden Rhamnoside und Arabinoside (Pyranosen) des Glucotropaeolins in Pflanzen der Familien der

Moringaceae und der Resedaceae diskutiert (Fahey et al., 2001). Die Pyranosylreste dieser Glucotropaeolin-Derivate sind allerdings glykosidisch an den Benzylring gebunden. Damit bestehen in diesen Fällen keine Parallelen zu den Diglucosiden, die in cyanogenen Pflanzen als Transportmetabolite vorkommen - bei denen Glycosylreste an die bereits vorhandene Glycosylgruppe aus der Grundstruktur der cyanogenen Glucoside gebunden sind und so diese Substanzen vor einer Hydrolyse durch apoplastische Monoglucosidasen schützen. Für die von Fahey beschriebenen Verbindungen werden bislang noch keine biologischen Funktionen diskutiert.

*Handelt es sich bei den gefundenen Inhaltsstoffen
um Transportformen des Glucotropaeolins?*

Bislang gelang es nicht, die in den Kapuzinerkressepflanzen vorherrschenden Verhältnisse hinsichtlich des Transports des Glucotropaeolins vollständig aufzuklären. Einige der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass das Glucotropaeolin in Form eines Diglucosids verlagert werden könnte, andere stehen noch scheinbar im Widerspruch dazu. In Anbetracht der Datenlage, ist eine Einbindung diglucosidischer Formen des Glucotropaeolins in den Phloemtransport äußerst wahrscheinlich:

Ein Teil (1/9.000) der im Blattmaterial von *Tropaeolum* nachweisbaren gesamten Myrosinase-Aktivität beruht auf Myrosinase, die im Apoplasten lokalisiert ist. Glucotropaeolin könnte diesen Ergebnissen zufolge nicht den Apoplasten passieren, ohne dass eine Hydrolyse stattfindet. Damit erscheint ein Transport des Glucotropaeolins über Glucosinolat-Glucoside durchaus angebracht, so wie dies bei den evolutionären Vorläufern der Glucosinolate, den cyanogenen Glucosiden, verwirklicht ist.

Dennoch, im scheinbaren Widerspruch hierzu scheint eine physiologische Notwendigkeit von Glucosinolat-Glucosiden zur Passage des Apoplasten nicht zwingend gegeben zu sein. Wider Erwarten finden sich in methanolischen Extrakten des Infiltrats sogar relativ große Mengen an Glucotropaeolin (ca. 0,5 % des gesamten Gehaltes der untersuchten Blätter), ohne dass in den Blattgeweben Verletzungen vorgelegen hätten, wie die Bestimmungen der Malat-dehydrogenase-Aktivität belegen.

Eine Lösung für diesen scheinbaren Widerspruch der Kollokalisierung von Glucotropaeolin, Myrosinasen (und vermutlich auch Ascorbinsäure als Oxidationsschutz) im apoplastischen Kontinuum, könnte durch eine Akkumulation der Einzelkomponenten in getrennten Bereichen erreicht werden. In der wissenschaftlichen Literatur wird häufig als ein Nachteil der Infiltrations-Technik diskutiert, dass keinerlei Aussagen bezüglich der genaueren Lokalisierung der isolierten Bestandteile des apoplastischen Kontinuums gemacht werden können (Lohaus et al., 2001).

So wäre es durchaus denkbar, dass das Vorkommen von Myrosinase, wie für *Brassica napus* beschrieben, auf den Bereich der Leitbündel in einzelnen Xylemzellen beschränkt ist

(Höglund et al., 1991), wohingegen die Glucosinolate in den Interzellularsystemen, die den Stomata und Hydathoden vorgelagert sind, lokalisiert sein könnten (siehe auch 4.2.5). Für den Aktivator der Myrosinasen, die Ascorbinsäure, wird eine Lokalisierung in den Zellwänden der Mesophyllzellen beschrieben (Turcsányi et al., 2000). Eine derartige, auf unterschiedliche Bereiche der Pflanze beschränkte differenzierte Verteilung apoplastischer Enzyme ist aus dem Bereich des Saccharose-Transports bekannt: hier ist das apoplastische Vorkommen der Invertase auf die „sink“-Gewebe beschränkt und für die Phloem-Entladung der Saccharose verantwortlich (Sherson et al., 2003).

Ein entsprechendes, räumlich differenziertes Auftreten der Einzelkomponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems, würde erklären, dass es durchaus möglich ist, dass Glucosinolate unbeschadet im apoplastischen Kontinuum neben Myrosinasen vorkommen können. Dennoch wäre mit der Lokalisierung der Myrosinase in Xylemzellen der Leitbündel auch die physiologische Notwendigkeit zur Existenz von diglucosidischen Transportmetaboliten gegeben, obwohl gleichzeitig große Mengen an Glucotropaeolin mit dem Infiltrat aus dem Apoplasten isoliert werden können.

Die wesentlichen Hinweise auf einen Transport des Glucotropaeolins als Diglucosid liegen in den gefundenen Unterschieden im Gehalt der putativen Diglucoside in den pflanzlichen Organen im Vergleich zu den Exsudaten der Transportsysteme (Guttationsflüssigkeit -Xylem und Nektar - Phloem), sowie in den ermittelten Verhältnissen der Peakflächen (putatives Diglucosid/Glucotropaeolin) der beiden Exsudate.

In den Extrakten aus unterschiedlichen Pflanzenteilen der Kapuzinerkresse wurden stets sehr niedrige Gehalte an putativen Diglucosiden nachgewiesen; dabei hatten die Blätter höhere Gehalte als die Samen, die Stängel enthielten die geringsten Mengen. Im Gegensatz dazu fanden sich deutlich höhere Gehalte an putativen Diglucosiden in den Exsudaten der pflanzlichen Transportsysteme (Guttationsflüssigkeit und Nektar). In der LC/MS wurden für diese Extrakte bis zu 1.000fach höhere Konzentrationen für die Moleküle mit einer Masse von $M_r=570$ g/mol gemessen als in den Extrakten aus den Pflanzenorganen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der putativen Diglucoside und dem pflanzlichen Transport.

Im Nektar von nur 2 Blüten (etwa 6 mg Zucker) ist eine vergleichbar große Menge an putativen Diglucosiden enthalten wie in rund 30 mL Guttationsflüssigkeit. Somit stellt der Nektar, der als Exsudat des Phloemsaftes eine nahezu identische Zusammensetzung hat wie die Phloemflüssigkeit, eine viel versprechende Quelle für die Isolierung der „Diglucoside“ des Glucotropaeolins dar. So beträgt das Verhältnis der Peakflächen (putatives Diglucosid/Glucotropaeolin) in der Guttationsflüssigkeit etwa 1:14 und im Nektar sogar 1:8. In diesem Zusammenhang sei nochmals darauf hingewiesen, dass der Gehalt der putativen Diglucoside in den Extrakten der Pflanzenorgane so gering ist, dass die entsprechenden Peakflächen oft gar nicht ermittelt werden können, bzw. dass die analytischen HPLC-Säulen

mit Glucotropaeolin überladen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die gefundenen putativen Diglucoside mit der Masse von $M_r=570$ g/mol im Phloem transportiert werden.

Es stehen jedoch noch eine Reihe von Analysen aus, um die tatsächlich *in vivo* vorliegenden Mechanismen zum Transport des Glucotropaeolins tiefer gehend verstehen zu können:

Als erstes sei an dieser Stelle die Strukturaufklärung der aufgereinigten Substanzen mit der Masse des putativen Diglucosids aufgeführt. Die entscheidende in Zukunft zu klärende Frage ist, ob es sich bei den vermeintlichen Glucotropaeolin-Glucosiden tatsächlich um strukturelle Homologe der cyanogenen diglucosidischen Transportmetabolite handelt, ob es sich also um Diglucoside handelt, bei denen das zweite Glucosemolekül terminal an das erste gebunden ist.

Danach muss eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den gefundenen Substanzen tatsächlich um Transportformen des Glucotropaeolins handelt. Hinsichtlich dieser Fragestellung sollten Isolate des Phloemsaftes der Kapuzinerkresse auf das Vorhandensein von „Diglucosinolaten“ untersucht werden. In der Vergangenheit wurden bereits in mehreren Arbeiten Glucosinolate als Inhaltsstoffe des Phloems anhand ihrer Desulfoformen identifiziert (Chen und Andreasson, 2001; Chen et al., 2001; Merrit, 1996; Weber et al., 1986). Jedoch die Möglichkeit einer Einbindung von Diglucosiden in den Transport der Glucosinolate zogen die zitierten Autoren mit Sicherheit nicht in Betracht, so dass diese Daten einer kritischen Überprüfung bedürfen.

In diesem Zusammenhang erscheint es wichtig, zwei weitere Aspekte zum Phloemtransport der Glucosinolate zu diskutieren:

- Zum einen könnte es sein, dass die Glucosinolat-Glucoside nach der Passage des Apoplasten bei Eintritt in das Phloem direkt wieder zu den entsprechenden Monoglucosiden umgewandelt werden. In diesem Fall würden die Glucosinolate - anders als die cyanogenen Glucoside - als Monoglucoside im Phloem verlagert werden. Dem entsprechend könnten im Phloemsaft nur die monoglucosidischen Glucosinolate nachgewiesen werden, trotz allem würden die Glucosinolat-Glucoside eine wichtige Rolle sowohl bei der Aufnahme der Glucosinolate in das Phloem in den „sources“ als auch bei der Abgabe in den Apoplasten in den „sinks“ spielen.
- Zum anderen könnte es sein, dass die zuvor zitierten Autoren die extrem geringen Mengen an Glucosinolat-Glucosiden schlichtweg übersehen haben oder aber analytisch nicht erfassen konnten, da der Anteil an monoglucosidischen Glucosinolaten im Phloemsaft ausgesprochen hoch ist. Merrit ermittelte 1996 für den Phloemsaft von *Brassica nigra* Sinigrin-Konzentrationen von 3-10 mM. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass das Sinigrin im Phloem nicht nur transportiert wird, sondern auch akkumuliert wird und der pflanzlichen Verteidigung im Bereich der Leitbündel dienen könnte (Meritt, 1996). Nach dieser Überlegung wäre es sogar denkbar, dass den Glucosinolaten im Phloem lediglich eine Funktion in der pflanzlichen Abwehr zuteil

sein könnte, wohingegen die Verlagerung der Glucosinolate über Glucosinolat-Glucoside stattfinden würde, die bislang einfach nur noch nicht analytisch erfasst worden sind.

Ein dritter Themenkomplex, der in Zukunft einer näheren Charakterisierung mit weiteren Untersuchungen bedarf, betrifft die Lokalisierung der Glucosinolate, Myrosinasen und Ascorbinsäure innerhalb des Apoplasten. Die genaue Lokalisierung der niedermolekularen Bestandteile, wie Glucotropaeolin und Ascorbinsäure, ist nach heutigem Stand der Technik nicht ohne Weiteres möglich, da diese Bestandteile in Dünnschnitten nicht oder nur ungenügend fixierbar sind, so dass die Anwendung spezifischer biochemischer Testverfahren oder Immunolokalisierungen mit spezifischen Antikörpern grundsätzlich erschwert ist.

Im Gegensatz dazu kann die Lokalisierung der Myrosinasen im Xylem oder in anderen apoplastischen Bereichen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden relativ leicht überprüft werden. Neben der Nutzung von spezifischen Antikörpern für histologische Analysen sind auch Transkriptionsanalysen ein viel versprechender Ansatz: unter Verwendung entsprechender homologer Sonden bereits bekannter Myrosinasen (Thangstad et al., 1993; Xue et al., 1995; Hara et al., 2000) könnte nach Myrosinase-Transkripten mit N-terminaler Apoplasten-Export-Signalsequenz (Masuda et al., 1999; Agüero et al., 2005) in *Tropaeolum* gesucht werden. Die hieraus synthetisierten cDNAs könnten als Konstrukte mit Reportergen fusioniert in das Genom von *Tropaeolum* reintegriert werden, um eine entsprechende gewebsspezifische *in vivo*-Lokalisierung der apoplastischen Myrosinase zu erfassen.

4.2.5 Die ökologische Relevanz apoplastischer Glucosinolate

Chen und Andreasson bezeichneten das Glucosinolat-Myrosinase-System als ein binäres chemisches Abwehr-System, dass bei Gewebsverletzungen aktiviert wird und zu den ersten chemischen Barrieren gehört, die der Abwehr eines breiten Spektrums potentieller Pathogene dienen (Chen und Andreasson, 2001). Die Autoren bezogen sich mit dieser Aussage auf das neuere, an *Arabidopsis thaliana* orientierte Modell der „Senfölbombe“, das als Komponenten die im Phloem lokalisierten Myrosinzellen und die innerhalb der Leitbündel liegenden glucosinolatreichen S-Zellen beinhaltet.

In dieser Arbeit wird erstmals das Vorkommen eines Glucosinolates im Bereich des Apoplasten beschrieben. Wie die parallele Aktivitätsbestimmung der im Symplasten lokalisierten Malatdehydrogenase beweist (0,004 nkat/g FG), resultiert das in den apoplastischen Waschflüssigkeiten nachgewiesene Glucotropaeolin wahrscheinlich nicht aus Gewebsverletzungen (siehe 4.2.1). Da die infiltrierten Blätter aber von Pflanzen aus dem Freilandanbau stammen, könnte es aber sein, dass das Glucotropaeolin im Zuge von in der Vergangenheit liegender Verletzungen z. B. durch Pathogenbefall freigesetzt wurde und nicht vollständig zu Senföl umgesetzt wurde. Diese von mikrobiellen Pathogenen erzeugten Mikro-

Verletzungen wären auch nicht mit dem bloßen Auge erkennbar. Allerdings ist dies eher unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch Malatdehydrogenase-Aktivität nachweisbar sein müsste.

Anders stellt sich die Situation für die Guttationsflüssigkeiten dar; für diese wurde eine verhältnismäßig hohe Malatdehydrogenase-Aktivität ermittelt (0,012 nkat/mL), so dass zumindest Teile des Glucotropaeolins und auch der Myrosinase aus Gewebsverletzungen wie z.B. Fraßschäden stammen dürften (siehe 4.2.1). Beim Sammeln der Guttationsflüssigkeiten wurden die Blätter auch nicht auf sichtbare Verletzungen geprüft wie die für die Infiltrationsversuche genutzten Blätter. Zusammenfassend kann bezüglich des apoplastischen Glucotropaeolins festgehalten werden, dass letztendlich nicht geklärt ist, woher es stammt, ob es aus - vielleicht früheren - Verletzungen stammt, oder ob es eine latente, sozusagen prophylaktische Absonderung von Glucotropaeolin in den Apoplasten gibt, so dass auch im Apoplasten eine auf Glucosinolaten basierende präformierte Abwehr gegen z.B. mikrobielle Pathogene existiert.

Das für die prinzipiell unverletzten Kapuzinerkresseblätter im Apoplasten nachgewiesene Glucotropaeolin läßt es dennoch sehr wahrscheinlich erscheinen, dass Glucosinolate auch in intakten Geweben in die extrazellulären Bereiche der Blattgewebe abgegeben werden.

Die Nachweise von Glucotropaeolin sowohl in den Guttationsflüssigkeiten als auch in den apoplastischen Waschflüssigkeiten weisen darauf hin, dass das dem Glucosinolat-Myrosinase-Systems nicht nur innerhalb des Symplasten Funktionen in der pflanzlichen Abwehr zukommt, sondern vermutlich auch in den extrazellulären, apoplastischen Bereichen. Wie der wissenschaftlichen Fachliteratur zu entnehmen ist, werden die Myrosinasen vor allem auch in den Schließzellen der Stomata (Thangstad et al., 2004; Husebye et al., 2002; Andréasson et al., 2001; Jörgensen, 1995) und in den Porenzellen der Hydathoden akkumuliert (mündliche Mitteilung, Prof. Dr. Ute Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU-Braunschweig), so dass die apoplastischen Glucosinolate vermutlich mit den Myrosinasen in den Blattporenzellen eine funktionale Einheit in der pflanzlichen Abwehr ausbilden könnten.

Aus den vorgestellten Ergebnissen ergibt sich das Bild einer erweiterten Funktion des Glucosinolat-Myrosinase-Systems in der Abwehr pflanzlicher Pathogene. Bei dem Eindringen von phytopathogenen Mikroorganismen über die Stomata oder aber auch Hydathoden, z. B. bei feuchter Witterungslage oder während der Guttation, könnte von den Porenzellen Myrosinase in die vorgelagerten Interzellularbereiche gelangen, so dass aus dem Glucotropaeolin im apoplastischen Feuchtfilm in sehr kurzer Zeit Senföle zur Bekämpfung der Pathogene freigesetzt werden können. Wie diese Verteidigungsmechanismen im Detail funktionieren, ist bislang noch nicht geklärt:

- Die Myrosinasen sind in den Porenzellen der Hydathoden und Stomata akkumuliert, ob sie aus diesen Zellen im Falle einer mikrobiellen Invasion aufgrund von

Zellverletzungen passiv freigesetzt werden oder vielleicht sogar aktiv in die Bereiche des mikrobiellen Befalls sekretiert werden, ist bislang völlig ungeklärt.

- Die mittlere Glucotropaeolin-Konzentration beträgt in den Guttationsflüssigkeiten rund 2 $\mu\text{mol/L}$. Diese Konzentration ist bei vollständiger Umsetzung zu Benzylisothiocyanat ($M_r=149,2 \text{ g/mol}$, entspricht rund 300 $\mu\text{g/mL}$) ausreichend, um das Wachstum mikrobieller Invasoren einzudämmen. So zeigten mehrere Studien, dass bereits Benzylisothiocyanat-Konzentrationen zwischen 0,3-50 $\mu\text{g/mL}$ im *in vitro*-Test bakterio- und fungistatische Wirkungen auf eine ganze Reihe von mikrobiellen Pathogenen haben (Schaffer, 1980; Winter, 1952; Stickl, 1955). Bislang ist jedoch völlig ungeklärt, wie das Glucotropaeolin in den Apoplasten gelangt. Denkbar wäre eine aktive oder passive Sekretion in den apoplastischen Feuchtfilmschicht der Interzellularen, der sowohl den Stomata als auch den Hydathoden vorgelagert ist.

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich mehrere Publikationen, die das Auftreten von verschiedenen Enzymen der pflanzlichen Abwehr in apoplastischen Waschflüssigkeiten bzw. Guttationsflüssigkeiten dokumentieren, so dass für den Apoplasten als Schnittstelle zur Außenwelt schon seit längerem wichtige Einbindungen in pflanzliche Schutz- und Abwehrmechanismen diskutiert werden.

Wie in Kapitel 4.2.1 ausführlich dargestellt, wurden bei Infiltrationsversuchen mit *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (Reis) und *Triticum aestivum* (Weizen) Glucanasen, Thaumatine und Germine nachgewiesen (Haslam et al., 2003). Im Apoplasten von *Hevea brasiliensis* wurden große Mengen an β -Glucosidase nachgewiesen (Kurzhaus et al., 1989). Entsprechend wurden in den Guttationsflüssigkeiten von *Hordeum vulgare* (Gerste) ebenfalls Glucanasen und Thaumatine, aber auch Chitinasen, Proteinasen sowie Peroxidasen nachgewiesen (Grunwald et al., 2003). Somit erscheint das Vorkommen von Myrosinase in den apoplastischen Waschflüssigkeiten und den Guttationsflüssigkeiten der Kapuzinerkresse auch nicht als besonders überraschend.

Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur aber so gut wie keine Hinweise auf pflanzliche Sekundärstoffe im Apoplasten, die in die pflanzliche Abwehr involviert sind. Lediglich von Selmar und Mitarbeitern (1996) wird das Vorkommen von Dhurrin in Guttationsflüssigkeiten von *Sorghum bicolor* beschrieben. Die Autoren begründen das ungewöhnliche apoplastische Auftreten dieses cyanogenen Glycosids damit, dass es aufgrund von Mikroverletzungen aus den Zellen in den Apoplasten „ausgeblutet“ sein könnte.

Die apoplastischen Glucosinolate und die daraus freisetzbaren Senföle spielen sicherlich nicht nur für die pflanzliche Abwehr eine wichtige Rolle, bildet doch der Apoplast über die den Hydathoden und den Stomata vorgelagerten Interzellularen eine wichtige Schnittstelle zur Außenwelt, so dass auch ökologische Wechselwirkungen zu anderen Lebewesen in der Umwelt der Pflanzen beeinflusst werden:

- Im letzten Jahrzehnt ist in der wissenschaftlichen Fachliteratur immer wieder die Frage aufgeworfen und letztendlich nie hinreichend geklärt worden, wie auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierte Insekten wie z. B. die Kleine Kohlfliege (*Delia radicum*), für die intakte Glucosinolate einen unabdingbaren Ovipositions-Stimulus darstellen, Zugang zu Glucosinolaten bekommen, ohne dass sie offensichtlich die Blattgewebe verletzen oder anderweitig in die Blattinnenbereiche eindringen müssen (Renwick, 2006; Reifenrath et al., 2005; Städler und Roessingh, 1991). Allgemein hin wurde angenommen, dass die Glucosinolate in der die Blattoberfläche begrenzenden kutikulären Wachsschicht enthalten oder aufgelagert sein müssen. In einer Studie von Reifenrath und Kollegen wird diese Annahme jedoch widerlegt und zudem an *Brassica napus* (Raps) und *Nasturtium officinale* (Brunnenkresse) gezeigt, dass an belichteten Blättern Glucosinolate über die Stomata aus den inneren Blattbereichen - vermutlich den Interzellularen - ausgewaschen werden können (Reifenrath et al., 2005). Zum einen stützen diese Ergebnisse die im Zuge dieser Dissertation aufgestellte Hypothese, dass Glucosinolate auch in intakten Blättern apoplastisch lokalisiert sein könnten, zum anderen kann anhand des in der Guttationsflüssigkeit der Kapuzinerkresse enthaltenen intakten Glucotropaeolins ein Weg aufgezeigt werden, wie Glucosinolate an die Blattoberfläche gelangen können, ohne dass die Blattgewebe verletzt werden müssen. So könnten auf glucosinolathaltige Pflanzen spezialisierte Insekten an intakte Glucosinolate gelangen, die sie als Ovipositions-Stimulus dienen, ohne dass sie die Kutikula oder die Epidermis beschädigen müssen.
- Ein anderer Aspekt die ökologischen Wechselwirkungen von glucosinolathaltigen Pflanzen und Insekten betreffend, besteht darin, dass aufgrund der vermuteten Colokalisierung von Glucosinolaten und Myrosinase im Apoplasten immer auch geringe Mengen an flüchtigen Hydrolyseprodukten der Glucosinolate (Isothiocyanate) über die Stomata in die Außenluft gelangen müssten. Diese könnten generalistische Insekten schon aus größerer Entfernung abschrecken. Leider finden sich hierzu in der wissenschaftlichen Literatur keine Hinweise. Im Gegensatz dazu ist es auch denkbar, dass Spezialisten durch die ständig in leichter Konzentration abgegebenen Senföle angelockt werden. So ist z. B. für die Kleine Kohlfliege (*Delia radicum*) beschrieben worden, dass sie die von Kohlpflanzen (*Brassica oleracea*) freigesetzten Senföle olfaktorisch wahrnehmen kann und zur Fernerkundung ihres Wirtes nutzt (De Jong und Städler, 1999).

Erste weiterführende Versuch an *vitro*-Pflanzen von *Tropaeolum majus* zeigten, dass sich tatsächlich in der Umluft von steril kultivierten *in vitro*-Pflanzen geringe Mengen an Benzylisothiocyanat nachweisen lassen (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurde die Luft aus den verschlossenen Kulturgefäßen mittels einer Umwälzpumpe vier Tage lang über eine Festphasenkartusche mit C₁₈-Material (Sep-Pak® light, Waters) als Adsorbens geleitet. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit einer geringen Menge Methanol gespült und das

entsprechende Eluat mit der HPLC analysiert. Diese Ergebnisse können als Indiz dafür gewertet werden, dass auch in intakten Kapuzinerkressepflanzen, die keinem Pathogen- oder Herbivorenbefall ausgesetzt waren, gewisse Mengen an Glucosinolaten und Myrosinase im Apoplasten vorhanden sein könnten, so dass beständig eine geringe Menge an flüchtigem Senföl freigesetzt wird. Allerdings hatten die untersuchten Pflanzen auch einige wenige in Folge von Alterungsprozessen vergilbte Blättchen, so dass nicht absolut sicherzustellen ist, dass die Blattgewebe völlig intakt und verletzungsfrei waren.

In der wissenschaftlichen Literatur finden sich widersprüchliche Hinweise hinsichtlich der Freisetzung von Senfölen aus intakten Pflanzen:

Agelopoulos und Keller (1994) wiesen in der Umluft intakter Kohlpflanzen Monoterpene wie α - und β -Pinen, Myrcen sowie Cineol nach. Senföle fanden die Autoren nicht. Im Gegensatz dazu wiesen Tollsten und Bergström (1988) in der Umluft intakter Pflanzen unterschiedlicher *Brassica*-Spezies neben Monoterpenen auch geringe Mengen an Isothiocyanaten und Nitrilen nach, hierzu gehörten z.B. Allyl-, sec-Butylisothiocyanat und Phenylacetonitril (Tollsten und Bergström, 1988). Die Herkunft dieser Senföle vermuteten die zitierten Autoren in Verletzungen, die bei der Probennahme entstanden sein könnten.

Letztendlich sind bezüglich des Themenkomplexes der ökologischen Relevanz apoplastischer Glucosinolate eine ganze Reihe weiterführender Experimente notwendig:

Primär sollte die Herkunft der apoplastischen Glucosinolate eindeutig geklärt werden. Bezüglich dieser Fragestellung erscheint es wichtig eindeutig differenzieren zu können, ob die Glucosinolate, wie allgemeinhin vermutet, aus Verletzungen stammen oder ob sie auch in intakten Pflanzen in den Apoplasten ausgeschieden werden und hier eine zweite präformierte Barriere in der pflanzlichen Abwehr ausbilden. Ein relativ leicht zu verwirklichender experimenteller Ansatz könnte darin bestehen zu prüfen, ob sich durch eine Induktion der pflanzlichen Abwehr, z. B. durch Gabe von Methyljasmonat, oder aber durch gezielte Verletzungen der Blattgewebe die Glucosinolat-Gehalte in den Guttationsflüssigkeiten im Vergleich zu dem der unbehandelten Pflanzen steigern lässt. Die Ergebnisse dieser Studie sollten Hinweise darauf geben, ob für das Vorhandensein von Glucosinolaten im Apoplasten Gewebsverletzungen eine Voraussetzung sind, oder ob auch in den Apoplasten intakter Gewebe, z. B. in Folge induzierter Abwehrreaktionen, Glucosinolate ausgeschieden werden.

Auch für diesen Themenkomplex stellt die Kenntnis der Lokalisierung der Glucosinolate, Myrosinasen und Ascorbinsäure im Apoplasten eine ganz zentrale wissenschaftliche Fragestellung dar, so dass, wie bereits im vorhergehenden Kapitel ausführlich diskutiert wurde (siehe 4.2.4), weitere Studien zur Lokalisierung der Einzelkomponenten des Glucosinolat-Myrosinase-Systems durchgeführt werden sollten.

Außerdem sind weiterführende Experimente zur ökologischen Relevanz der apoplastischen Glucosinolate bzw. den daraus freisetzbaren Senfölen denkbar. In diesem Zusammenhang scheint es besonders interessant zu klären, ob die Guttationsflüssigkeiten der Kapuzinerkresse

die Oviposition spezialisierter Insekten zu stimulieren vermögen und ob tatsächlich von intakten Pflanzen stets geringe Mengen von Senfölen freigesetzt werden, die Auswirkungen auf die komplexen ökologischen Wechselwirkungen der glucosinolathaltigen Pflanzen haben sollten, wie z. B. die Attraktion von Spezialisten und die Abschreckung von Generalisten.

5 Zusammenfassung

5.1 Phytochemisch-pharmazeutische Aspekte

Die Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) ist eine traditionelle Heilpflanze. Die Blätter, Samen und Blüten dieser Pflanze enthalten große Mengen des Glucosinolates Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat). Dieses Thioglucosid besitzt zwar selbst keine Heilwirkungen, es ist jedoch die Vorstufe und stabile Lagerungsform des daraus gebildeten bioaktiven Benzylsenföls. Das Benzylsenföl ist ein komplexes Gemisch an Substanzen, das sich aus der Hauptkomponente Benzylisothiocyanat und den beiden Nebenkomponten Benzylnitril und Benzylthiocyanat zusammensetzt. Das Benzylsenföl wird nach der postmortalen Hydrolyse des Glucotropaeolins durch das in der Kapuzinerkresse enthaltene Enzym Myrosinase (EC 3.2.1.147) gebildet und ist hauptsächlich für die Heilwirkungen des Kapuzinerkressekrautes verantwortlich. In der heutigen Zeit werden für die Kapuzinerkresse insbesondere die unterstützende Behandlung von bakteriellen Infektionen der ableitenden Harnwege und der Atemwege, sowie die äußere Anwendung bei leichten Muskelschmerzen hervorgehoben.

In dieser Arbeit wird der erstmalige Versuch beschrieben, die Kapuzinerkresse hinsichtlich einer pharmazeutischen Nutzung züchterisch zu bearbeiten. Das Züchtungsziel besteht darin, Varietäten zu selektieren, die neben einem möglichst hohen Wirkstoffgehalt in der Trockendroge auch möglichst niedrige Myrosinase-Aktivitäten im Blattmaterial aufweisen, um die Verluste bei der Ernte und Trocknung möglichst gering zu halten. Des Weiteren sollte die „Medizinalkapuzinerkresse“ für die *in vitro*-Kultur geeignet sein, mit deren Hilfe die Stammerhaltung und Vermehrung erfolgen soll, zudem sollen die Pflanzen einen kompakten Wuchs aufweisen, um bei der manuellen Beerntung Verluste durch erntebedingte Verletzungen so gering wie möglich zu halten.

Diesen Vorgaben entsprechend wurde in den Jahren 2003-2005 ein *screening* an über 200 einzelnen Kapuzinerkresssepflanzen einer Saatgutmischung durchgeführt. Im Zuge dieses *screenings* wurden die drei für das Glucosinolat-Myrosinase-System relevanten biochemischen Parameter Ascorbinsäure-Gehalt, Myrosinase-Aktivität und Glucosinolat-Gehalt untersucht.

Entsprechend der Aktivierungscharakteristika der Myrosinase aus *Tropaeolum* sollte der Ascorbinsäure-Gehalt im frischen Blattmaterial deutlich unter einer Konzentration von 1 mM liegen, da nur in diesem Konzentrationsbereich die Myrosinase unvollständig aktiviert vorliegt, so dass die Verluste an Glucosinolaten bei der Ernte und Trocknung minimiert werden könnten. Allerdings zeigten die Analysen, dass in allen Pflanzen die Ascorbinsäure-Konzentrationen mit 8-35 mmol/kg FG weit über der Konzentration für eine optimale Aktivität der Myrosinase liegen, so dass es praktisch keine Pflanzen gibt, in denen die Myrosinase nach Gewebeerstörung nicht vollständig aktiviert vorliegt. Deshalb wurde der Parameter Ascorbinsäure-Gehalt in den folgenden Jahren des *screenings* nicht mehr in die

Untersuchungen einbezogen, bzw. als Selektionsparameter verworfen. Abschließend ist anzumerken, dass die Kapuzinerkresse mit ähnlich hohen Gehalten an Vitamin C wie in Sanddorn aus ernährungsphysiologischer Sicht eine hervorragende Vitamin C-Quelle darstellt.

Der zweite im Zuge dieser Arbeit untersuchte Parameter ist die Myrosinase-Aktivität. Die auf HPLC basierenden enzymologischen Analysen ergaben, dass die Myrosinase-Aktivität in den Blättern einzelner Pflanzen zwischen 0,17-4,1 $\mu\text{mol/g TG}$ (Faktor 25) schwankt. Diese individuell sehr großen Unterschiede in der Myrosinase-Aktivität legten nahe, Pflanzen mit besonders niedrigen Myrosinase-Aktivitäten zu selektieren, um die Verluste an Glucotropaeolin bei der Ernte und Trocknung der Blätter möglichst gering halten zu können. Allerdings zeigte ein Vergleich zwischen den *in vivo* gemessenen Myrosinase-Aktivitäten und den tatsächlichen Trocknungsverlusten an Glucosinolaten (40°C), dass kein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen besteht. Offensichtlich beeinflussen noch andere bislang unbekannte Faktoren, wie die Stabilität der Zellwände oder durch Trockenstress induzierte Proteine, die Höhe der Verluste an Glucosinolaten während der Trocknung. Deshalb wurde für die Selektion als einziger biochemischer Parameter der Glucosinolat-Gehalt in der Trockendroge herangezogen.

Die Glucosinolat-Gehalte variieren sowohl zwischen den einzelnen Blättern einer Pflanze, als auch zwischen den einzelnen Pflanzen stark. Die höchsten Glucosinolat-Gehalte wurden mit rund 120 $\mu\text{mol/g TG}$ in den jungen Blättern der Triebspitze gemessen, wohingegen die Glucosinolat-Gehalte in den ausgewachsenen, älteren Blättern mit rund 45 $\mu\text{mol/g TG}$ um etwa 2/3 niedriger liegen. Die tatsächlichen Glucosinolat-Gehalte (nach Gefriertrocknung) in den einzelnen Pflanzen variierten im Jahr 2005 um etwa den Faktor 2 zwischen 33-70 $\mu\text{mol/g TG}$, der mittlere Gehalt wurde mit etwa 47 $\mu\text{mol/g TG}$ bestimmt. In den ofengetrockneten Blattmaterialien (Frischlufttrockenschrank, $T=40^\circ\text{C}$) der entsprechenden Pflanzen variierten die Glucosinolat-Gehalte vergleichbar stark, wiesen aber mit einem mittleren Gehalt von etwa 45 $\mu\text{mol/g TG}$ 5 % niedrigere Glucosinolat-Gehalte in Folge der Ernte- und Trocknungsverluste auf. Diese Ergebnisse belegen die sehr gute Eignung der Trocknung im Frischlufttrockenschrank bei 40°C zur Gewinnung von Blatttrockendroge mit hohen Wirkstoff-Gehalten.

Im Zuge des *screenings* wurden die Glucosinolat-Gehalte von über 200 Pflanzen ermittelt und untereinander verglichen. Acht Varietäten mit besonders hohen Glucosinolat-Gehalten in der Trockendroge und einem kompaktem Wuchs wurden erfolgreich in die *in vitro*-Kultur zur Stammerhaltung und Vermehrung überführt.

Im Gegensatz zu den Ursprungspflanzen enthielten die Blätter der *in vitro*-Pflanzen auf den MS-Festmedien nur sehr geringe Glucosinolat-Gehalte, sie betrugen lediglich zwischen 15-75 % der Gehalte in den Mutterpflanzen. Die Kultur der *in vitro*-Pflanzen auf MS-Festmedien mit variierenden Sulfatkonzentrationen zeigte, dass eine enge Beziehung

zwischen der Verfügbarkeit von Sulfat im Medium und dem resultierenden Glucosinolat-Gehalten in den Blättern der *in vitro*-Pflanzen besteht. Auf MS-Medien mit im Vergleich zu den Standard-Medien (1,7 Mm) erhöhtem Sulfatgehalt von 8,3 mM enthielten die *in vitro*-Pflanzen Glucotropaeolin-Gehalte von rund 58-81 µmol/g TG. Diese Werte sind nahezu gleich hoch wie in den Mutterpflanzen, so dass die beobachtete Verminderung der Glucosinolat-Gehalte durch einen Mangel an verfügbarem Sulfat erklärt werden kann, und eine generelle Minderung der Glucosinolat-Biosynthese während der *in vitro*-Kultur der Kapuzinerkresse nicht eintritt.

In den Jahren 2005 und 2006 wurden aus den *in vitro*-Pflanzen der selektierten Kapuzinerkresse-Varietäten rund 13.000 Regenerate im Feldanbau getestet und auf ihre Glucosinolat-Gehalte hin untersucht:

Die Regenerate im Feldanbau wiesen zwischen 23-56 % niedrigere Glucosinolat-Gehalte als ihre Mutterpflanzen im Gartenanbau auf. Außerdem enthielten die Regenerate im Jahr 2006 mit einem mittleren Glucosinolat-Gehalt von etwa 52,2 µmol/g TG auch rund 25 % niedrigere Gehalte auf als die unter vergleichbaren Bedingungen angebauten Pflanzen einer Saatgutmischung, für die im Mittel ein Glucosinolat-Gehalt von 68,5 µmol/g TG bestimmt wurde. Diese Ergebnisse zeigen, dass die eingeschlagene Strategie der Erhaltungszüchtung von hoch glucosinolathaltigen Kapuzinerkresse-Varietäten mittels *in vitro*-Kultur in Bezug auf die erzielbaren Glucotropaeolin-Gehalte in der Trockendroge keine Vorteile gegenüber der Aussaat genetisch heterogener Saatgutmischungen bringt. Der einzige Vorteil der Regenerate gegenüber den Pflanzen der Saatgutmischung liegt in dem gleichmäßigen kompakten Wuchs, wodurch die manuelle Beerntung erleichtert wird. Die Ursache für die generell niedrigeren Glucosinolat-Gehalte in den Regeneraten ist bislang völlig ungeklärt, diskutiert werden die Unterschiede in der Entwicklung zu den aus Samen herangezogenen Pflanzen und die für die Pflanzen Kraft kostenden Umstellungen von der *in vitro*-Kultur zum Ackeranbau.

5.2 Pflanzenphysiologisch-biochemische Aspekte

Im zweiten Teil der hier vorliegenden Dissertation werden Aspekte zum Transport der Glucosinolate bearbeitet. Im Gegensatz zu den meisten anderen pflanzlichen Sekundärstoffen unterliegen die Glucosinolate postmortalen Degradationen durch hydrolytische Enzyme, den Myrosinasen. Ein apoplastisches Vorkommen dieser Enzyme hat weitreichende Konsequenzen für den Langstreckentransport, so dass hinsichtlich des Transports der Glucosinolate spezielle Anforderungen resultieren, um Hydrolysen der Glucosinolate zu vermeiden.

Sollte die Myrosinase in *Tropaeolum*, ähnlich wie die β -Glucosidase in den cyanogenen Pflanzen, in großen Mengen apoplasmatisch lokalisiert sein, dann sollten sich - in Analogie zu den cyanogenen Diglucosiden - auch Glucosinolat-Glucoside in der Kapuzinerkresse

nachweisen lassen, die verhindern, dass Hydrolysen der Glucosinolate im Zuge der apoplastischen Phloembeladung auftreten.

Dieser Arbeitshypothese folgend wurde zunächst überprüft, ob sich in apoplastischer Waschflüssigkeit der Kapuzinerkresse Myrosinase-Aktivität nachweisen lässt. In dieser Dissertation konnte erstmals das Vorkommen von signifikanten Myrosinase-Aktivitäten in der apoplastischen Waschflüssigkeit einer Pflanze nachgewiesen werden. Die gemessene Aktivität beträgt mit 0,002 nkat/g FG zwar lediglich 1/9.000 der Myrosinase-Aktivität im symplastischen Enzymrohextrakt der Blätter. Doch der Vergleich mit der symplastischen Malatdehydrogenase zeigt, dass im Infiltrat wesentlich geringere Anteile dieses symplastischen Markers vorkommen als Myrosinase. Damit ist bewiesen, dass es sich bei den gemessenen Myrosinase-Aktivitäten nicht um Kontaminationen symplastischen Ursprungs sondern tatsächlich um apoplastische Myrosinase handelt.

In Folge dieses eindeutigen positiven Nachweises apoplastischer Myrosinase-Aktivität, wurden pflanzliche Exsudate, die mit dem Transport in Zusammenhang stehen, wie Guttationsflüssigkeit und Nektar, sowie apoplastische Waschflüssigkeit auf das Vorhandensein von putativen Glucotropaeolin-Glucosiden mittels HPLC/MS untersucht.

Zwar konnte bislang kein eindeutiger Nachweis für das Vorhandensein der postulierten Diglucoside erbracht werden, doch die HPLC/MS-Daten haben das Vorhandensein von vier Substanzen belegt, die alle ein Molekulargewicht von $M_r=570$ g/mol aufweisen. Die Auswertung der Unterfragmentierungen der gefundenen Substanzpeaks bestätigt, dass es sich tatsächlich um Derivate des Glucotropaeolins handelt. Zudem ist der verhältnismäßige Anteil der putativen Diglucoside im Nektar, einem Exsudat des Phloems, am höchsten, wie dies entsprechend der vermuteten Einbindung dieser Substanzen in den Phloemtransport zu erwarten wäre. Allerdings gelang es bislang nicht die putativen Diglucoside quantitativ zu isolieren und einen eindeutigen Strukturnachweis mittels Kernresonanzspektroskopie durchzuführen.

Mit dem Vorhandensein von Glucotropaeolin in Guttationsflüssigkeit und apoplastischer Waschflüssigkeit wird erstmals auch die apoplastische Lokalisierung eines Glucosinolates beschrieben. In der Guttationsflüssigkeit ist die Glucotropaeolin-Konzentration mit rund $2\text{ }\mu\text{M}$ ausreichend hoch, dass bei vollständiger Umsetzung zu Benzyliothiocyanat das Wachstum mikrobieller Pathogene inhibiert werden könnte. Die Vermutung liegt nahe, dass das apoplastisch lokalisierte Glucotropaeolin in Verbindung mit der oftmals in Schließ- und Hydathodenzellen lokalisierten Myrosinase eine den pflanzlichen Geweben vorgelagerte Verteidigungslinie zur Bekämpfung mikrobieller Pathogene ausbilden könnte. Weiterführende Untersuchungen zu der apoplastischen Lokalisierung von Myrosinase und Glucosinolaten, sowie zu den Funktionen apoplastischer Glucosinolate und Myrosinase in den ökologischen Wechselwirkungen der Pflanzen stehen allerdings noch aus.

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien besaßen mindestens p.a.-Qualität, sämtliche für die HPLC verwendeten Chemikalien (NH₄Ac) einschließlich des Wassers und der Lösungsmittel waren von HPLC-Qualität.

Standardsubstanzen

Ascorbinsäure

D-(+) Glucose anhydrous: Fluka (Buchs, Deutschland)

Glucotropaeolin Kaliumsalz: C₂ Bioengineering aps. (Kopenhagen, Dänemark)

Benzylisothiocyanat: Fluka (Buchs, Deutschland)

Benzylthiocyanat: Fluka (Buchs, Deutschland)

Benzylnitrit: Fluka (Buchs, Deutschland)

6.2. HPLC-Anlage

Analytik der Myrosinase-Aktivitäten und Glucotropaeolin-Gehalte

Pumpe: LC Pump, Series 410, Perkin Elmer

Autosampler: „Marathon“, Spark Holland

Injektionsvolumen: 50 µL

Detektor: LC 90 UV, Spectrophotometric Detector; Perkin Elmer

Säule: 25 x 0,4 cm Nucleosil 120-5-C18

Software: Chromeleon

6.3 LC/MS-Apparatur

Analytik der Glucosinolat-Glucoside

Typ: Bruker-HP Esquire-LC

Injektionsvolumen: 20 µL

Säule: 25 x 0,4 cm Nucleosil 120-5-C18

Software: Bruker Daltonics Data Analysis 3.0

6.4 Sonstige Materialien

L-Ascorbinsäure Farb-Test: Boehringer (Mannheim, Deutschland)

Gelfiltrationssäulen: PD10-Columns/GE-Healthcare Bio Sciences
(Uppsala, Schweden)

SPE-Kartuschen: Sep-Pak[®] Light C18 Cartridges/Waters (Milford, USA)

Spritzenfilteraufsatz: Chromafil[®] RC-20/25/Macherey-Nagel (Düren, Germany)

6.5 Pflanzenmaterialien

Im ersten Jahr des Projektes wurde sehr unterschiedliches Saatgut in einem örtlichen Gartenmarkt käuflich erworben, hierzu gehörten die Kapuzinerkressesorten „Rankende Prachtmischung“, „Milky Way“, „Alaska“ und „Scarlett“. Ab dem zweiten Jahr des Projektes wurde das Saatgut von der Firma Dreluso Pharmazeutika in Hessisch-Oldendorf zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine nicht züchterisch bearbeitete Saatgutmischung der Spezies *Tropaeolum majus*.

6.6 Anbaubedingungen und Probennahme

6.6.1 Pflanzen des *screenings*

Für das *screening* der Kapuzinerkressepflanzen wurden zwei Versuchsflächen angelegt. Die eine liegt direkt auf dem Grundstück des Instituts für Pflanzenbiologie (Mendelssohnstraße 4, TU Braunschweig) und weist eine Fläche von ca. 30 m² auf, zweite befindet sich auf dem Gelände des Botanischen Gartens in Braunschweig und umfasst etwa 50 m².

Der Boden der Versuchsflächen wurde Anfang Mai, rund zwei Wochen vor dem Pflanzen der Kapuzinerkressepflanzen, mit organisch-mineralischem NPK-Dünger (Compo Guano, Münster, Deutschland) gedüngt. Diese Düngergabe entsprach auf eine Anbaufläche von einen Hektar bezogen rund 55 kg Stickstoff, 30 kg Phosphat, 20 kg wasserlösliches Kaliumoxid und 15 kg Magnesiumoxid.

Um im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode Probennahmen bei den einzelnen, oftmals sehr stark rankenden Kapuzinerkressepflanzen zu ermöglichen wurden die Pflanzen mit einem sehr hohen Pflanzabstand von 100 cm gepflanzt.

Zur Bestimmung von Myrosinase-Aktivitäten und Glucosinolat-Gehalten der Einzelpflanzen wurden jeweils 15 ausgewachsene Blätter pro Pflanze geerntet und noch direkt auf der Anbaufläche in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die tief gefrorenen Blätter wurden direkt ins Labor transportiert und mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Im Anschluss wurde das Blattmaterial gefriergetrocknet.

Parallel hierzu wurden weitere 15 ausgewachsene Blätter von den jeweiligen Einzelpflanzen geerntet und bei 40°C im Trockenschrank (Frischlufrocknung) getrocknet, um die individuellen Trocknungsverluste der Kapuzinerkressepflanzen im *screening* zu bestimmen. Die Trocknungszeit betrug rund 5 Tage.

6.6.2 Pflanzen im Feldanbau (FAL, Braunschweig)

Am Institut für Pflanzenkultur in Schnega wurden aus den *in vitro*-vermehrten Klonen der Stammerhaltung Pflanzen regeneriert. Die Pflanzen wurden in leicht aufgedüngtes Torfsubstrat (Einheitserde Typ P) in Pikierplatten gepflanzt (Topfvolumen 70 cm³, 60 Pflanzen pro Platte). Nach einer achtwöchigen Akklimatisierungsphase in einem Folienzelt

bei hoher Luftfeuchtigkeit und gleich bleibende Temperatur (20°C) wurden die Pflanzen zum Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde der FAL in Braunschweig geliefert.

Die Pflanzungen der Regenerate erfolgten umgehend an dem Tag nach der Auslieferung am 25.05.2005 und 30.05.06 auf einem Versuchsfeld an der FAL, Braunschweig. Die Pflanzen wurden per Hand gepflanzt. Sämtliche im Zuge dieser Arbeit untersuchte Regenerate entstammen Parzellen in denen der Pflanz- und Reihenabstand 30 cm betrug und eine einmalige Düngergabe von 100 kg N/ha und 100 kg S/ha kurz nach der Pflanzung erfolgte (Elementarschwefel, Kumulus WG).

Die Ernte der Blattmaterialien erfolgte wie unter 6.6.1 beschrieben.

6.7 *in vitro*-Kultur von *Tropaeolum majus*

Für die Stammerhaltung der glucosinolatreichen Varietäten mittels *in vitro*-Kulturtechnik wurden Achselabschnitte der Sprosse mehrfach sterilisiert (1 % NaOCl in 70 % Ethanol) und anschließend in 0,8 % Agarose enthaltendes MS-Medium (Murashige and Skoog, 1962) in Petrischalen überführt. Als Wachstumsregulatoren enthielt das Medium 0,1 ppm TDZ (1-Phenyl-3-(1,2,3-Thiadiazol-5-yl-urea) 0,5 ppm Indoleessigsäure (IES). Die tägliche Belichtungszeit betrug 14 h. Die Temperatur im Kulturraum betrug 25°C. Nachdem sich vitale *in vitro*-Pflanzen entwickelt hatten, wurden jeweils fünf davon vorsichtig abgetrennt und in 100 mL MS-Medium enthaltende Einweckgläser übergesetzt. Ein Umsetzen der *in vitro*-Pflänzchen auf frische Medien erfolgte regelmäßig alle vier Wochen.

Zur Bestimmung des Einflusses der Sulfatkonzentration im Medium auf den Glucosinolat-Gehalt in den Blättern der *in vitro*-Pflanzen, wurde die Menge an MgSO₄ in Abwandlung vom Standardmedium variiert. Die im Medium eingestellten Sulfatkonzentrationen betrugen 0,2, 0,6, 1,7 (Standard) oder 8,3 mM.

6.8 Bestimmung von Ascorbinsäure-Gehalten

6.8.1. Prinzip der photometrischen Bestimmung

Für die Bestimmung der Ascorbinsäure-Gehalte von Blättern der Kapuzinerkresse wurde ein käuflicher Farbtest aus der Lebensmittelanalytik verwendet (L-Ascorbinsäure Farb-Test, Boehringer Mannheim, Deutschland).

Das diesem Test zugrunde liegende Prinzip besteht in der selektiven Erfassung der reduktiven Potentiale der Extrakte. L-Ascorbinsäure und auch andere in den Extrakten enthaltene Reduktionsmittel reduzieren das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in Gegenwart des Elektronencarriers PMS (5-Methylphenaziniummethosulfat) bei pH 3,5 zu einem farbigen Formazan. Die Konzentration dieses Farbstoffes kann über die photometrische Bestimmung der Extinktion bei 578 nm ermittelt werden. In einem ersten Ansatz wird die gesamte aus allen reduzierenden Substanzen resultierende Extinktion ermittelt, wohingegen in einem parallelen Ansatz die Ascorbinsäure

selektiv mit Hilfe von Ascorbatoxidase zu Dehydroascorbat oxidiert wird. Das hierbei entstehende Dehydroascorbat vermag kein farbiges Formazan mit MTT zu bilden, so dass aus der zu ermittelnden Extinktionsdifferenz der beiden Ansätze auf den molaren Anteil der L-Ascorbinsäure geschlossen werden kann.

6.8.2 Extraktion von L-Ascorbinsäure

Von den einzelnen Pflanzen wurden jeweils zehn Blätter direkt auf dem Feld in flüssigem Stickstoff schockgefroren und homogenisiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Analysen wurden jeweils rund 60 mg des tiefgefrorenen Blattmaterials in 750 µL 15 % (w/v) meta-Phosphorsäure-Lösung (4 mM Na₂EDTA) pH 3,5 für 3 min mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend für 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Die gesamte Extraktion und alle folgenden Arbeitsgänge wurden auf Eis unter Ausschluss von Licht durchgeführt, um einen Zerfall der empfindlichen Ascorbinsäure zu verhindern. Im Anschluss wurde der Extrakt verdünnt (1:10). Von dieser Lösung wurde 1 mL für die Ascorbinsäure-Bestimmung eingesetzt. Die Inkubation zur Gehaltsbestimmung erfolgte entsprechend der ausführlichen Anweisungen in der Testbeschreibung.

6.8.3 Photometrische Bestimmung

Pro Extrakt wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, so dass jeweils vier Ansätze erstellt wurden. Zwei Ansätze für den Probe-Leerwert, in denen die Ascorbinsäure selektiv durch Oxidation mit Ascorbatoxidase zu Dehydroascorbat entfernt wurde. Und zwei Ansätze für die Bestimmung des gesamten reduktiven Potentials des Extraktes einschließlich der L-Ascorbinsäure.

Die Inkubation erfolgte unter weitestgehendem Ausschluss von Licht bei 37°C. In jeweils vier Glasküvetten (d=1cm) wurden 1000 µL der Lösung 1 (MTT in Natriumphosphat/Citrat-Puffer pH 3,5), 1000 µL der Blattextrakte und 600 µL bidest. H₂O pipettiert. Im Anschluss wurde in zwei Ansätzen die L-Ascorbinsäure durch Oxidation zu Dehydroascorbat entfernt. Dazu wurde der Inhalt der Küvetten in Zeitabständen von 2 min für 5 s mit den dem Test beiliegenden Ascorbatoxidase-Spateln dreimal gut durchmischt. Es erfolgte die Messung der diesen Mischungen zu Grunde liegenden Eigenextinktion bei 578 nm (E_1). Der Gebrauchsanweisung des Tests folgend wurden in alle vier Ansätze 100 µL der PMS-Lösung pipettiert und das Gemisch für weitere 15 min bei 37°C inkubiert, die Bildung des Formazans war durch eine Gelbfärbung erkennbar. Nach der Inkubation wurden erneut die Extinktionen bei 578 nm ermittelt. Basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz wurden mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von MTT-Formazan bei 578 nm ($\epsilon_{578}=16,9 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) die Ascorbinsäure-Gehalte im Blattmaterial berechnet.

6.9 Bestimmung von Myrosinase-Aktivitäten

6.9.1 HPLC-Bestimmung von Glucose

Die zur Bestimmung der Myrosinase-Aktivität verwendete HPLC-Methode, ist eine Abwandlung der von Galensa und Schäfers (1981, x) entwickelten Methode zur Bestimmung von Kohlenhydraten in Lebensmitteln. Diese Bestimmungsmethode wurde entsprechend den Erfordernissen an eine Myrosinase-Aktivitätsbestimmung in *Tropaeolum* adaptiert und optimiert (Kleinwächter 2004). Das dieser Bestimmungsmethode zugrunde liegende Prinzip beruht darauf, dass Kohlenhydrate, wie z. B. die im Zuge der hydrolytischen Spaltungen durch Myrosinasen freigesetzte Glucose, die mit Benzoylchlorid derivatisiert werden, durch das Einfügen der aromatischen Benzoylgruppen ein intensives UV-Maximum bei 230 nm erhalten und somit sehr gut mittels UV-Detektion nachgewiesen werden können. Die Auftrennung der Benzoylderivate erfolgt an einem gebräuchlichen Umkehrphasen-System.

6.9.2 Herstellung von Enzymrohextrakten

Von 60 im Freiland angebauten Pflanzen wurden jeweils 15 Blätter direkt auf dem Versuchsfeld in Stickstoff schockgefroren, ins Labor transportiert und in flüssigem Stickstoff mit Hilfe von Mörser und Pistill homogenisiert. Die Blatthomogenate wurden gefriergetrocknet und bis zu der Herstellung der Enzymrohextrakte bei -20°C gelagert.

Für die Gewinnung der Enzymrohextrakte wurden 100 mg des gefriergetrockneten Blattmaterials mit 10 mL eines 25 mM Phosphatpuffers nach Sörensen (pH 5,7) versetzt und mit einem Ultra-Turrax für 2 min homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat filtriert (Miracloth; Serva, Heidelberg) und für 1 h bei 30.000 x g zentrifugiert. Die Abtrennung der niedermolekularen Bestandteile des Extraktes, die zum Teil auch mit dem Enzymtest interferieren könnten (wie z.B. Ascorbinsäure, Glucose und Glucotropaeolin), erfolgte mit Hilfe von PD-10 Gelfiltrationssäulen. 2 mL des Überstands wurden auf die PD-10 Säulen gegeben. Einer weiteren Gabe von 0,5 mL des 25 mM Sörensen-Puffers folgte die Elution der Proteinfraction mit 2,5 mL Puffer. Die niedermolekularen Bestandteile wurden in einem anschließenden Waschschrift mit 25 mL des Puffers entfernt, und die Säulen konnten für einen weiteren Aufreinigungsgang benutzt werden.

6.9.3 Inkubationen zur Aktivitätsbestimmung der Myrosinase

Die Inkubationen erfolgten als Doppelbestimmung. Jeweils 10 µL des Enzymrohextraktes wurden mit Glucotropaeolin (Endkonzentration: 1mM) und Ascorbinsäure (Endkonzentration: 2mM) in einem Gesamtvolumen von 1 mL des 25 mM Sörensen-Puffers (pH 5,7) inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 20 min bei einer Temperatur von 30°C. Das Stoppen der enzymatischen Reaktionen erfolgte durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff. Im Anschluss wurden 500 µL einer 1 mM Arbutinlösung als Interner Standard hinzugefügt. Die gesamte Mischung wurde über Nacht gefriergetrocknet. Der trockene Rückstand wurde mit

1 mL Methanol für 5 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 x g wurde der Überstand in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment wurde ein weiteres Mal mit 0,5 mL Methanol extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden im Luftstrom eines Evaporators bei 40°C bis zur Trockene eingengt. Der vollständig von Methanol befreite Rückstand wurde in 200 µL Pyridin aufgenommen und zur Derivatisierung eingesetzt.

6.9.4. Derivatisierung der Proben

Die Pyridin-Extrakte aus dem Myrosinase-Assay wurden mit 25 µL Benzoylchlorid versetzt und für 1 h bei 60°C im Ultraschallbad derivatisiert. Überschüssiges Benzoylchlorid wurde durch Zugabe von 25 µL Methanol zu Methylbenzoat umgesetzt. Im Anschluss wurden die stark hydrophoben Benzoate mit 2 mL kaltem Wasser gefällt. Mit Hilfe einer Festphasenextraktion konnten die Benzoate quantitativ aus dem Pyridin/Wasser-Gemisch isoliert werden. Hierzu wurde die entstandene Suspension auf eine zuvor mit 2 mL Methanol und 2 mL Wasser konditionierte und equilibrierte Festphasenextraktions-Kartusche (Sep-Pak Light, Waters) gegeben. Das Pyridin und die anderen hydrophilen Bestandteile wurden mit 4 mL Wasser aus der Kartusche gewaschen. Anschließend wurden die Benzoate mit 2 mL eines Lösungsmittel-Gemisches aus iso-Oktan, Diethylether und Acetonitril (15:8:2, v/v/v) von den Kartuschen eluiert. Um eine quantitative Elution sicherzustellen, wurde ein zweites Mal unter identischen Bedingungen eluiert. Überschüssiges Wasser wurde mit Hilfe einer Pipette von den vereinten organischen Phasen entfernt. Im Anschluss wurde das Elutionsmittel im Evaporator bei 40°C vollständig abgedampft. Die als bräunliche, viskose Flüssigkeit erkennbaren Benzoate wurden in 1 mL HPLC-Fließmittel (siehe 6.9.5) aufgenommen.

6.9.5 Chromatographie der Benzoylderivate

Für die flüssigchromatographische Auftrennung der Benzoate wurde die unter 6.2 aufgeführte Anlage verwendet. Die Säulentemperatur betrug 50°C. Die Detektions-Wellenlänge lag bei 230 nm. Das Fließmittel bestand aus einem Gemisch aus Acetonitril, Wasser, tert-Buthylmethylether (6:4:1, v/v/v), und die Elution erfolgte isokratisch mit einer Flussrate von 1 mL/min. Die Retentionszeiten für die Benzoylderivate von Glucose, Glucotropaeolin und Arbutin, lagen bei etwa 12, 16 und 18 min. Die Quantifizierung der Glucose-Gehalte erfolgte über die Kalibriergerade eines Glucose-Standards und wurde um den Wert des aus der Wiederfindung des Internen Standards ermittelten Faktors korrigiert.

6.10 Bestimmung von Glucotropaeolin-Gehalten

6.10.1 Prinzip der HPLC-Bestimmung

Das Benzylglucosinolat Glucotropaeolin besitzt als grundlegende Struktur, wie sie allen Glucosinolaten gemein ist, eine C=N Doppelbindung, aus der eine ausgeprägte Absorption bei 235 nm resultiert (Olsen und Sørensen 1981), wodurch in einem HPLC-System eine sehr empfindliche UV-Detektion möglich ist. Des Weiteren besitzt Glucotropaeolin eine Benzylgruppe, die ebenfalls in diesem Bereich absorbiert. Aufgrund seines hydrophoben Charakters ist Glucotropaeolin vor allem für eine flüssigchromatographische Auftrennung über ein Umkehrphasensystem geeignet.

Die zunächst beobachtete unzureichende Auftrennung in einem Standard Wasser/Methanol-Gemisch (94:6, v/v) als mobile Phase, konnte durch Zugabe von NH₄Ac (40 mM) zur Pufferung optimiert werden.

6.10.2 Extraktion des Glucotropaeolins

Rund 20 mg des fein gemahlenden Blattmaterials wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß eingewogen und mit 800 µL Methanol (RT) versetzt. Nach kurzem Mischen (Vortex) folgte eine Inkubation von 5 min im Ultraschallbad (50°C). Hier wurde sichergestellt, dass sämtliche Enzyme, darunter die hydrolytischen Myrosinasen, nicht gelöst bzw. zum Teil denaturiert wurden. Dem methanolischen Extrakt wurden 160 µL einer 43,5 mM NH₄Ac-Lösung sowie 40 µL einer 10 mM Arbutinlösung als Interner Standard zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min im Ultraschallbad (50°C) wurden die Proben für 10 min bei 13.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Reaktionsgefäß transferiert. Der resultierende Rückstand wurde in einem zweiten Extraktionsgang mit 800 µL Methanol und 200 µL der 43,5 mM NH₄Ac-Lösung für 10 min im Ultraschallbad bei 50°C nach extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min) bei 13.200 U/min wurden beide methanolisch-wässrigen Überstände vereinigt. Das resultierende Sediment wurde in einem dritten Extraktionsgang, der dem vorherigen entsprach, erneut gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt. In einer Vakuumzentrifuge wurde das Methanol-Wasser-Gemisch der vereinten Überstände bis auf ein Restvolumen von etwa 200 µL abgedampft. Durch diese Vorgehensweise erhöht sich aufgrund der wesentlich niedrigeren Flüchtigkeit des Wassers in Relation zum Methanol der Wasseranteil im Extraktionsmittel, wodurch die Ausfällung hydrophober Bestandteile des Extraktes, wie z.B. Chlorophyll und Lipide, erfolgt. Nach dieser Fällung wurde das Restvolumen des Extraktes bestimmt und mit Reinstwasser exakt auf ein Volumen von 600 µL aufgefüllt. Dem Extrakt wurden 1280 µL der 43,5 mM NH₄Ac-Lösung sowie 120 µL Methanol zugesetzt und so die Probe auf ein Endvolumen von 2000 µL aufgefüllt. Nach Zentrifugation (10 min) bei 13200 U/min wurden die Proben über einen Membranfilter mit 0,2 µm Porendurchmesser filtriert und zur anschließenden Chromatographie eingesetzt.

6.10.3 Chromatographie des Glucotropaeolins

Die unter 6.2 beschriebene HPLC-Anlage wurde für die Analyse der Glucosinolat-Gehalte verwendet. Die Ofentemperatur betrug 30°C, die Detektion erfolgte bei 230 nm und der Durchfluss betrug 1 mL/min. Für eine optimale Analyse des Glucotropaeolins wurde das folgende Gradienten-Programm entwickelt:

Step 1:	8 min FM 1	H ₂ O/Methanol (94/6, v/v)	isokratisch
Step 2:	3 min FM 2	H ₂ O/Methanol (86/14, v/v)	Stufengradient
Step 3:	2 min auf FM 3	H ₂ O/Methanol (20/80, v/v)	linearer Gradient
Step 4:	6 min FM 3	H ₂ O/Methanol (20/80, v/v)	isokratisch
Step 5:	2 min auf FM 1	H ₂ O/Methanol (94/6, v/v)	linearer Gradient
Step 6:	15 min FM 1	H ₂ O/Methanol (94/6, v/v)	isokratisch

(sämtliche Fließmittel enthielten 40 mM NH₄Ac)

Um die Säule zwischen den einzelnen Analysen zu reinigen, wurde ein Waschschrift von 6 min eines stark eluierenden Fließmittels in das Gradientenprogramm eingefügt (FM 3: H₂O/Methanol (20/80, v/v), 40 mM NH₄Ac). Die Retentionszeiten der Glucoside Arbutin (Interner Standard) und Glucotropaeolin lagen bei etwa 5 und 11 min. Die Berechnung der Glucotropaeolin-Gehalte erfolgte über die Kalibriergerade eines Standards. Die ermittelten Gehalte wurden um den Wert des ermittelten Faktors aus der Widerfindung des Internen Standards Arbutin korrigiert.

6.11 Gewinnung von Extrakten aus apoplastischer Waschflüssigkeit

6.11.1 Infiltration

10 Blätter (9,41 g FG) wurden in etwa 3 cm Entfernung von der Blattspreite am Stängel abgetrennt. Die Blattspreiten wurden in eine Petrischale mit 50 mL einer 100 mM NaCl-Lösung, die mit einer Spatelspitze Detergenz versetzt wurde, gelegt. Hierbei wurde sichergestellt, dass die verletzten Gewebe an den Schnittstellen der Stängel nicht in Kontakt mit der Salzlösung kommen, um Kontaminationen der Infiltrationsflüssigkeit mit Zellflüssigkeit cytoplasmatischen Ursprungs möglichst zu vermeiden. Die sich in der Salzlösung befindenden Blätter wurden im Exsikkator unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe mehrmals vorsichtig infiltriert, hierbei wurde der Exsikkator leicht geschwenkt. Die infiltrierten Blattbereiche färbten sich durch die langsam in den Apoplasten vordringende Infiltrationslösung nach und nach dunkelgrün. Die vollständig infiltrierten Blätter wurden für 1 h in 50 mL einer zweiten NaCl-Lösung (100 mM) geschwenkt.

6.11.2 Herstellung der Enzymextrakte

Im Anschluss wurde die apoplastische Waschflüssigkeit ($V=96$ mL) mittels Gelfiltrations-säulen (PD-10) von den niedermolekularen Bestandteilen getrennt. 2,5 mL des Infiltrats wurden jeweils auf die mit H_2O dest. equilibrierten PD-10 Säulen gegeben. Die Elution der Proteinfraction erfolgte mit 3,5 mL H_2O dest.. Die auf der Säule verbliebenen niedermolekularen Bestandteile wurden in einem anschließenden Waschschrift mit 25 mL H_2O dest. entfernt und gleichzeitig für einen weiteren Aufreinigungsgang equilibriert.

Die aufgereinigten Proteinfractionen wurden vereint, eingefroren ($-20^{\circ}C$) und gefriergetrocknet. Der verbleibende, weißliche Rückstand wurde in 1 mL Wasser aufgenommen. Aliquots dieses Enzymrohextraktes der Apoplastenflüssigkeit wurden für die Bestimmungen der Myrosinase- und Malatdehydrogenase-Aktivitäten eingesetzt (siehe 6.11.4 bzw. 6.11.5).

Parallel zu dem Enzymextrakt aus der apoplastischen Waschflüssigkeit wurde aus den Blättern derselben Pflanze ein Enzymrohextrakt gewonnen, um die Vergleiche von symplastischen und apoplastischen Myrosinase- und Malatdehydrogenase-Aktivitäten zu ermöglichen. Die frischen Blätter wurden zu diesem Zweck in flüssigem Stickstoff homogenisiert. 1g frisches Blattmaterial wurde mit 10 mL 25 mM Puffer nach Sørensen (pH 5,7) versetzt und wie unter 6.9.2 beschrieben zum Enzymrohextrakt verarbeitet.

6.11.3 Extraktion der Glucoside

In einem zweiten Ansatz wurden 15 Blätter (13,88 g FG) der Kapuzinerkresse wie oben beschrieben infiltriert. Die apoplastische Waschflüssigkeit wurde aber nicht über Gelfiltrationssäulen aufgereinigt, sondern lediglich sterilfiltriert (Porendurchmesser= $0,2\ \mu m$), anschließend eingefroren und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde zur Abtrennung der Proteine mit 3 x 1 mL eines Methanol/Wasser-Gemisches (9/1, v/v) extrahiert. Nach Zentrifugation (10 min) bei 13.200 U/min wurde der Überstand abgetrennt und das Lösungsmittel in einer Vakuumzentrifuge abgedampft. Der trockene Rückstand wurde in 200 μL MeOH/ H_2O (9/1, v/v) aufgenommen. Für die Analysen an der HPLC/MS wurde ein Aliquot von 50 μL dieses Extraktes an der Vakuumzentrifuge zur Trockene eingeeengt und in 100 μL HPLC-Fließmittel (H_2O /Methanol (94/6, v/v), 40 mM NH_4Ac) aufgenommen, hiervon wurde ein Volumen von 20 μL für die Analyse an der esi-LC/MS eingesetzt.

6.12 Schnelltest der Myrosinase-Aktivität

6.12.1 Prinzip der HPLC-Bestimmung von Benzylsenfölen

Die Ermittlung der Absorptionsspektren der drei Haupthydrolyseprodukte des Glucotropaeolins Benzylcyanid, Benzylthiocyanat und Benzylisothiocyanat ergab, dass alle drei Substanzen eine ausgeprägte Absorption bei $\lambda=220$ nm aufweisen. Entsprechend erfolgte die Detektion in den HPLC-Analysen mit einem UV-Spektrophotometer bei der

Detektionswellenlänge von $\lambda=220$ nm. Für die Auftrennung der wegen ihres Benzylrestes ausgesprochen hydrophoben Einzelkomponenten des Benzylsenföls konnte auch in diesem Fall ein Umkehrphasesystem genutzt werden.

6.12.2 Myrosinase-Assay

Die Inkubationen erfolgten als Doppelbestimmungen. Jeweils 60 μL des Enzymrohextraktes wurden mit Glucotropaeolin (Endkonzentration: 1 mM) und Ascorbinsäure (Endkonzentration: 2 mM) in einem Gesamtvolumen von 100 μL eines 25 mM Phosphatpuffers nach Sörensen (pH 5,7) bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatischen Reaktionen wurden nach $t=0$ min, 20 min, 60 min und 120 min durch Zugabe von 200 μL Methanol gestoppt und anschließend auf Eis gestellt. Der gesamte Ansatz wurde für 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, sterilfiltriert (0,2 μm) und der HPLC-Analytik zugeführt.

6.12.3 Chromatographie von Benzylsenföl

Für die flüssigchromatographische Auftrennung des während der enzymatischen Reaktion gebildeten Benzylsenföls wurde die unter 6.2 aufgeführte HPLC-Anlage verwendet. Die Säulentemperatur betrug 30°C. Die Detektions-Wellenlänge lag bei $\lambda=220$ nm. Ein Fließmittelgemisch aus Methanol und Wasser (65:35, v/v) erwies sich für die Auftrennung der einzelnen Bestandteile des Benzylsenföls als besonders gut geeignet. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0,8 mL/min isokratisch.

Die Analysen von Standards der einzelnen Komponenten des Benzylsenföls ergaben Retentionszeiten von 4, 5 und 13 min (Benzylcyanid, Benzylthiocyanat bzw. Benzylisothiocyanat). Da unter den Inkubationsbedingungen des Myrosinase-Assays (6.12.1) lediglich Benzylisothiocyanat als einziges Reaktionsprodukt nachgewiesen werden konnte, genügte es für die anschließende Kalkulation der Enzymaktivitäten die Kalibriergerade eines Benzylisothiocyanat-Standards heranzuziehen.

6.13 Bestimmung von Malatdehydrogenase-Aktivitäten

Da die Malatdehydrogenase ausschließlich im Symplasten lokalisiert ist, wird der Nachweis ihrer Aktivität häufig als Marker symplastischer Kontaminationen herangezogen. Auf diese Weise wird es möglich während des Infiltrierens auftretende, auch mit dem bloßen Auge nicht sichtbare Verletzungen in den Blattgeweben nachzuweisen, welche die Ergebnisse der folgenden Aktivitäts-Bestimmungen verfälschen würden.

6.13.1 Prinzip der photometrischen Bestimmung von MDH-Aktivitäten

Die Malatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Malat zu Oxalacetat unter Reduktion eines Reduktionsäquivalentes NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$, bzw. in Abhängigkeit der Konzentrationen der Edukte und Produkte auch die entsprechende Rückreaktion.



Da NADH^+ ein Extinktionsmaximum bei $\lambda=340$ nm aufweist, während NAD^+ bei dieser Wellenlänge nicht absorbiert, kann die im Zuge der enzymatischen Reaktionen auftretenden Konzentrations-Änderungen an NAD^+ bzw. $\text{NADH}+\text{H}^+$ am Spektralphotometer nachvollzogen werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Infiltrationsversuche wurden die Enzymaktivitäten für die Rückreaktion der MDH vom Oxalacetat zum Malat als Marker symplastischer Kontaminationen herangezogen.

6.13.2 Malatdehydrogenase-Assay

In einer Photometerküvette wurden 2,5 mL eines 50 mM Tris/HCl-Puffers (pH 7,8), 0,1 mL einer $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Lösung (2 mg/mL) sowie 0,2 mL der erstellten Enzymlösungen (siehe 6.11.2) pipettiert und vermischt. Nach einer Vorinkubation von 30 s wurde die enzymatische Reaktion mit 0,2 mL einer Na-Oxalacetat-Lösung (1 mg/mL) gestartet.

Am Photometer wurde für eine Zeitspanne von 5 min die Extinktionsänderung bei 340 nm gemessen. Anhand der aus diesem Spektrum ermittelten Geradensteigung und dem Extinktionskoeffizienten von $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ bei 340 nm ($\epsilon_{340} \text{ nm}=6,3 \text{ L} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) wurden die MDH-Aktivitäten kalkuliert.

6.14 LC/MS-scan nach Glucotropaeolin-Glucosiden

6.14.1 Herstellung von Extrakten aus Guttationsflüssigkeit

Im September bzw. Oktober der Jahre 2005/2006 wurde früh morgens zur Zeit des Taupunktes (Luftfeuchtigkeit nahezu 100 %) Guttationsflüssigkeit gesammelt. Die Blätter wurden vorsichtig geschüttelt und die abperlenden Guttationstropfen in Plastikschalen gesammelt. Die Guttationsflüssigkeit wurde über eine feinmaschige Papiergaze filtriert und noch direkt auf dem Feld in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Nach Gefriertrocknung wurde der verbleibende, granulatartige tiefbraune, stark riechende Rückstand (ca. 500 mg) dreimal mit reichlich $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1, v/v) extrahiert. Das MeOH wurde am Rotationsverdampfer abgedampft. Das im Kolben verbleibende Restwasser wurde durch eine erneute Gefriertrocknung entfernt. Der Rückstand aus anfänglich ca. 1500 mL Guttationsflüssigkeit wurde in 1500 μL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (9/1, v/v) aufgenommen, 20 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und über einen Spritzenfilteraufsatz sterilfiltriert. Das Endvolumen des Extraktes wurde mit 1600 μL ermittelt.

Für die HPLC/MS-Bestimmungen wurden Aliquots von 25 bzw. 150 μL an der Vakuumzentrifuge vom Lösungsmittel befreit und in jeweils 100 μL HPLC-Fließmittel ($\text{H}_2\text{O}/\text{Methanol}$ (94/6, v/v), 40 mM NH_4Ac) aufgenommen. Hiervon wurde jeweils ein Volumen von 20 μL für die Analyse injiziert.

6.14.2 Herstellung von Extrakten aus Nektar

Zur Gewinnung von Blütennektar wurden Gilson-Pipettenspitzen (200 µL) mit einem ca. 2 cm langen Stück eines dünnen Silikonschlauches versehen. Jeweils 50 µL H₂O dest. wurden damit in den Blütenstempel der Kapuzinerkresseblüten pipettiert. Durch mehrmaliges vorsichtiges auf und ab pipettieren des Wassers wurde der hochviskose Nektar gelöst und konnte dann in einen Rundkolben überführt werden. Mit dieser Methode wurde der Nektar von 400 Kapuzinerkresseblüten isoliert. Anschließend wurde die resultierende wässrige Zuckerlösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gefriergetrocknet.

Der verbleibende weißliche, kristalline hauptsächlich aus Saccharose bestehende Rückstand wurde in MeOH/H₂O (9/1, v/v) aufgenommen und über einen Spritzenfilteraufsatz (0,2 µm) sterilfiltriert. Das Endvolumen des Extraktes betrug 2 mL. Von diesem Extrakt wurde ein Aliquot von 50 µL in der Vakuumzentrifuge von dem Lösungsmittel befreit und in 100 µL HPLC-Fließmittel (H₂O/Methanol (94/6, v/v), 40 mM NH₄Ac) aufgenommen. 20 µL dieser Probe wurden für die Analytik mit esi-HPLC/MS-Anlage eingesetzt.

6.14.3 Chromatographie-Bedingungen

Für die Suche nach Glucotropaeolin-Glucosiden wurde die unter 6.3 beschriebene Electrospray Ionization-HPLC/MS-Anlage des Institutes für Lebensmittelchemie der TU Braunschweig benutzt.

Für die zu Beginn der HPLC/MS-Analytik durchgeführten Analysen an den Extrakten der Guttationsflüssigkeit (siehe 6.14.1) wurde ein methanolhaltiges Fließmittel-System verwendet. Von Fließmittel A, H₂O/Methanol (94/6, v/v; 40 mM NH₄Ac), ausgehend (t=0 min, A=100 %) wurde bei gleich bleibender Flussrate von 0,8 mL/min ein linearer Gradient verwendet, bei dem 100 % Fließmittel B, H₂O/Methanol (20/80, v/v; 40 mM NH₄Ac), innerhalb von 40 min erreicht wurde (t=40 min, B=100 %).

Alle weiteren Analysen (Extrakte aus 6.11.3, 6.14.1, 6.14.2) wurden mit tetrahydrofuranhaltigen Fließmitteln durchgeführt, um die Auftrennung der putativen Diglucoside vom Glucotropaeolin zu ermöglichen. Von Fließmittel A, H₂O/THF (97/3, v/v; 40 mM NH₄Ac), ausgehend (t=0 min, A=100 %) wurde bei gleich bleibender Flussrate von 0,8 mL/min ein linearer Gradient zu 100 % Fließmittel B, H₂O/THF (20/80, v/v; 40 mM NH₄Ac), innerhalb von 40 min durchgeführt (t=40 min, B=100 %).

Detektion und Auswertung

Die Polarität der gemessenen Ionen war negativ. Mit Hilfe des Auswertungsprogramms (Bruker Daltonics Data Analysis 3.0) wurde gezielt nach Substanzpeaks mit der Masse der putativen Glucotropaeolin-Glucoside gescannt (408,4 g/mol (Glucotropaeolin-Anion) + 180,16 g/mol (Glucose) - 18 g/mol (H₂O)=570,56 g/mol (Glucotropaeolin-Glycosid)).

7 Literaturverzeichnis

- ADLER, L. S. (2000) **The ecological significance of toxic nectar.** *Oikos*, **91**: 409-420
- AFZALPURKAR, A. B. (1974) **Tissue cultures of rapeseed glucosinolates and fatty acid composition.** *Fette Seifen Anstrichmittel*, **76**: 439-442
- AGELOPOULOS, N. G., KELLER, M. A. (1994) **Plant-natural enemy association in tritrophic system, *Cotesia rubecula*-*Pieris rapae*-brassicaceae (cruciferae). III: Collection and identification of plant and frass volatiles.** *J. Chem. Ecol.*, **20** (8): 1955-1967
- AGERBIRK, N., OLSEN, C. E., SOERENSEN, H. (1998) **Initial and final products, nitriles, and ascorbigens produced in myrosinase-catalyzed hydrolysis of indole glucosinolates.** *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 1563-1571
- AGUERO, C.-B., DANDEKAR, A.-M., MEREDITH, C.-P. (2005) **Transgenic grapevine plants expressing green fluorescent proteins targeted to the apoplast.** *Acta-Horticult.*, **689**: 475-479
- ANDRÉASSON, E., JÖRGENSEN, L. B., HÖGLUND, A.-S., RASK, L., MEIJER, J. (2001) **Different Myrosinase and Idioblast Distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*.** *Plant Physiol.*, **127**: 1750-1763
- BAK, S., NIELSEN, H. L., HALKIER, B. A. (1998a) **The presence of CYP79 homologues in glucosinolate-producing plants show evolutionary conservation of the enzymes in the conversion of amino acid to aldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glycosides and glucosinolates.** *Plant Mol. Biol.*, **38**: 725-734
- BAK, S., KAHN, R. A., NIELSEN, H. L., MÖLLER, B. L., HALKIER, B. A. (1998b) **Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glycoside dhurrin.** *Plant Mol. Biol.*, **36**: 393-405
- BAK, S., TAX, F. E., FELDMANN, K. A., GALBRAITH, D. W., FEYEREISE, R. (2001) **CYP83B1, a cytochrome P450 at the metabolic branch point in auxin and indole glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*, **13**: 101-111
- BARTEL, B., FINK, G. R. (1994) **Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 6649-6653
- BARTLET, E., KIDDLE, G., WILLIAMS, I., WALLSGROVE, R. (1999) **Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist.** *Entomol. Exp. Appl.*, **91**: 163-167

Bayerische Landesanstalt für Ernährung

URL: www.stmfl.bayern.de/lfe/ernaehr/gesundheit/vitcgemuese.html, letzter Zugriff: 14.11.01

- BENNETT, R. N., LUDWIG-MÜLLER, J., KIDDLE, G., HILGENBERG, W., WALLSGROVE R. M. (1995) **Developmental regulation of aldoxime formation in seedlings and mature plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* sp. *Pekinensis*) and oilseed rape (*Brassica napus*): glucosinolate and IAA biosynthesis enzymes**. *Planta*, **114**: 239-244
- BENNETT, R. N., KIDDLE, G., WILLIAMS, I., DAWSON, G. W., WALLSGROVE, R. M. (1996) **Distribution and activity of microsomal NADPH-dependent monooxygenases and amino acid decarboxylases in cruciferous plants, and their relationship to foliar glucosinolate content**. *Plant Cell Environ.*, **19**: 801-812
- BENNETT, R. N., KIDDLE, G., WALLSGROVE R. M. (1997) **Involvement of cytochrome P450 in glucosinolate biosynthesis in white mustard**. *Plant Physiol.*, **114**: 1283-1292
- BERGMANN, F. (1970) **Die Glucosinolat-Biosynthese im Verlauf der Ontogenese von *Sinapis alba* L.** *Z. Pflanzenphysiol.*, **62**: 362-375
- BERNARDI, R., NEGRI, A., RONCHI, S., PALMIERI, S. (2000) **Isolation of the epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization**. *FEBS Letters*, **467**: 296-298
- BIALY, Z., OLESZEK, W., LEWIS, J., FENWICK, G. R. (1990) **Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glucosides) and their degradation products against wheat**. *Plant Soil*, **129**: 277-282
- BIRCH, A. N. E., GRIFFITHS, D. W., MACFARLANE SMITH, W. H. (1990) **Changes in forage and oilseed rape (*Brassica napus*) root glucosinolates in response to attack by turnip root fly (*Delia floralis*)**. *J. Sci. Food Agric.*, **51**: 309-320
- BJÖRKMAN, R., JANSON, J.-C. (1972) **Studies on myrosinases. I. Purification and chracteritation of a myrosinase from white mustard seed (*Sinapis alba* L.)** *Biochim. Biophys. Acta*, **276**: 508-518
- BJÖRKMAN, R., LÖNNERDAL, B. (1973) **Studies on myrosinases. III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis alba* and *Brassica napus* seeds**. *Bichim. Biophys. Acta*, **327**: 121-131
- BJÖRKMAN, R. (1976) **Properties and function of plant myrosinases**. In: *The Biology and Chemistry of Cruciferae*. (Hrsg. J. G. Vaughan, A. J. MacLeod, B. M. G. Jones) Academic Press, London: 191-205

- BLOEM, E., HANEKLAUS, S., PELOW, E., SATOR, C., KÖHLER, T., SCHNUG, E. (2001) **The effect of sulphur and nitrogen fertilisation on the glucotropaeolin content in *Tropaeolum majus* (L.)**. In: XXXVI. Vortragstagung Gewürz- und Heilpflanzen, Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung, Freising-Weihenstephan: 185-190
- BONES A. M., SLUPPHAUG, G. (1989) **Purification, characterization and partial amino acid sequencing of β -thioglucosidase from *Brassica napus* L.** J. Plant Physiol., **134**: 722-729
- BONES, A. M. (1990) **Distribution of β -thioglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerated plants of *Brassica napus* L.**J. Exp. Bot., **41**: 737-744
- BONES A. M., ROSSITER J. T. (1996) **The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry**. Physiol. Plant., **97**: 194-208
- BONES A. M., ROSSITER J. T. (2006) **The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates**. Phytochem., **67**: 1053-1067
- BRADER, G., TAS, E., PALVA, E. T. (2001) **Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora***. Plant Physiol., **126**: 849-860
- BRIDGES, M., JONES A. M., BONES, A. M., HODGSON, C. ET AL. (2002) **Spatial organization of the glucosinolate-myrosinase system in brassica specialist aphids is similar to that of the host plant**. Proc. R. Soc. Lond. B, **269**: 187-191
- BROWN, P. D., MORRA, M. J. (1995) **Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides**. J. Agric. Food Chem., **43**: 763-771
- BROWN, P. D., TOKUHISA, J. G., REICHEL, M., GERSHENZON, J. (2003) **Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana***. Phytochem., **62**: 471-481
- BRUDENELL, A. J. P., GRIFFITHS, H., ROSSITER, J. T., BAKER, D. A. (1999) **The phloem mobility of glucosinolates**. J. Experimental Botany, **50** (No. 335): 745-756
- BURMEISTER, W. P., COTTAZ, S., HUGUES, D., IORI, R., PALMIERI, S., HENRISSAT, B. (1997) **The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase**. Structure, **5**: 663-675
- BURMEISTER, W. P., COTTAZ, S., ROLLIN, P., VASELLA, A., HENRISSAT, B. (2000) **High Resolution X-ray Crystallography Shows That Ascorbate Is a Cofactor for Myrosinase and Substitutes for the Function of the Catalytic Base**. J. Biol. Chem., **275**: 39385-39393

- BUROW, M., BERGNER, A., GERSHENZON, J., WITTSTOCK, U. (2006) **Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*-identification of the thiocyanate-forming protein.** Plant Mol. Biol., **63**: 49-61
- BUSKOV, S., OLSEN, C. E., SÖRENSEN, H., SÖRENSEN, S. (2000) **Supercritical fluid chromatographie as basis for identification and quantitative determination of indol-3-ylmethyl oligomers and ascorbigens.** J. Biochem. Biophys. Methods, **43**: 175-195
- BUSKOV, S., SERRA, B., ROSA, E., SOERENSEN, H., SOERENSEN J. C. (2002) **Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis* cv. Woll)** J. Agric. Food Chem., **50**: 690-695
- BUSSY, A. (1840) **Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde.** J. Pharm., **27**: 464-471
- CHALLENGER, F. (1959) **The natural mustard oil glucosides and the related isothiocyanates and nitriles.** In: Aspects of the Organic Chemistry of Sulphur. Butterworths, London, UK: 115-161
- CHEN, S., HALKIER, B. A. (2000) **Characterization of glucosinolate uptake by leaf protoplasts of *Brassica napus*.** J. Biol. Chem., **275** (30): 22955-22960
- CHEN, S., ANDREASSON, E. (2001) **Update on glucosinolate metabolism and transport.** Plant Physiol. Biochem., **39**: 743-758
- CHEN, S., PETERSEN, B. L., OLSEN, C. E., SCHULZ, A., HALKIER, B. A. (2001) **Long-Distance Phloem Transport of Glucosinolates in *Arabidopsis*.** Plant Physiology, **127**: 194-201
- CHEN, Y. R., HAN, J., KORI, R., KONG, A. N., TAN, T. H. (2002) **Phenylethyl isothiocyanate induces apoptotic signaling via suppressing phosphatase activity against c-Jun N-terminal kinase.** J. Biol. Chem., **277**: 39334-39342
- CHEW, F. S. (1988) **Biological effects of glucosinolates.** In: Biologically Active Natural Products Potential Use in Agriculture. (Hrsg. H. G. Cutler) American Chemical Society Press, Washington: 155-181
- CHISHOLM, M. D., WETTER, L. R. (1964) **Biosynthesis of mustard oil glucosides. IV. The administration of Methionine-C¹⁴ and related compounds to horseradish.** Can. J. Biochem., **42**: 1033-1040
- COHNEN, C., LAWNICZAK, D. (2005) **Die Kapuzinerkresse.** In: Blütenmythen. Natur Mensch Medizin Verlags GmbH, Bad Boll: 44-49

- COLE, R. A. (1996) **Abiotic induction of changes to glucosinolate profiles in Brassica species and increased resistance to the specialist aphid Brevicoryne brassicae.** Entomol. Exp. Appl., **80**: 228-230
- DAHLGREN, R. (1977) **A commentary on a diagrammatic presentation of the angiosperms in relation to the distribution of character states.** Plant Syst. Evol. (Suppl. 1): 253-283
- DAHLGREN, R., ROSENDAL-JENSEN, S., NIELSEN B. J. (1981) **A revised classification of the angiosperms with comments on correlation between chemical and other characters.** In: Phytochemistry and Angiosperm Phylogeny. (Hrsg. D. A. Young, D. S. Seigler) Praeger, New York: 149-202
- DAXENBICHLER, M. E., VANETTEN, C. H., WOLFF, I. A. (1968) **Diastereomeric episulfides from epi-progoitrin upon autolysis of Crambe seed meal.** Phytochem.; **7**: 989-996
- DECREANE, L. P. R., SMETS, E. F. (2001) **Floral developmental evidence for the systematic relationships of *Tropaeolum* (*Tropaeolaceae*).** Annals Botany., **88**: 879-892
- DE JONG, R., STÄDLER, E. (1999) **The influence of odour on the oviposition behaviour of the cabbage root fly.** Chemoecology, **9**: 151-154
- DE LA BARRERA, E., NOBEL, P. S. (2004) **Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin.** Trends Plant Sci., **9** (2): 65-69
- DOUGHTY, K. J., KIDDLE, G. A., PYE, B. J., WALLSGROVE, R. M., PICKETT, J. A. (1995) **Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate.** Phytochem., **38**: 347-350
- DROBNICA, L., DEMJANENKO, A.P. (1972) **Einfluss von 6-Isothiocyanatkapronsäure und ihrer Äther auf einige Stoffwechselvorgänge bei Mikroorganismen.** Mikrobiol. Zh. (Kiev), **34**: 9-10
- DROBNICA, L., GEMEINER, P. (1976) **Use of isothiocyanates as “reporter” groups in modification of enzymes.** In: Protein Struct. Evol., Int. Union Biochem. Symp. 1975, Akademie Verlag, Berlin
- DU, L. C., HALKIER, B. A. (1996) **Isolation of a microsomal enzyme system involved in glucosinolate biosynthesis from seedlings of *Tropaeolum majus* (L.).** Plant. Physiol., **111**: 831-837
- DU, L. C., HALKIER, B. A. (1998) **Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*.** Phytochem., **48**: 1145-1150
- ENGEL, E., BATY, C., LE CORRE, D., SOUCHON, I., MARTIN, N. (2002) **Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance.** J. Agric. Food Chem., **50**: 6459-6467

- ETIENNE, H.M BERTHOULY, M. (2002) **Temporary immersion systems in plant micropropagation**. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, **69**: 215-231
- ETTLINGER, M. G., LUNDEEN, A. J. (1957) **First synthesis of a mustard oil glucoside: the enzymatic Lossen rearrangement**. J. Am. Chem. Soc., **79**: 1764-1765
- FAHEY, J. W., ZALCMANN, A. T., TALALAY, P. (2001) **Review. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants**. Phytochem. , **56**: 5-51
- FAHEY, J. W., HARISTOY, X., DOLAN, P. M., KENSLE, T. W., SCHOLTUS, I. (2002) **Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[α]pyrene-induced stomach tumors**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99**: 7610-7615
- FEENY, P. (1976) **Glucosinolates**. In: Biochemical Interaction between plants and insects. (Hrsg. J. Wallace, R. Mansell) American Chemical Society, Washington
- FIELD, B., CARDON, G., TRAKA, M., BOTTERMAN, J., VANCANNEYT, G., MITHEN, R. (2004) **Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis***. Plant Physiol., **135**: 828-839
- FISHER, D. B., FRAME, J. M. (1984) **A guide to the use of the exuding-stilet technique in phloem physiology**. Planta **161**: 385-393
- FOO, H. L., GRONNING, L. M., GOODENOUGH, L. et al. (2000) **Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis**. FEBS Letters, **468**: 243-246
- FRANZ, G. (1996) **Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus* L.) Portrait einer Arzneipflanze**. Z. Phytotherapie, **17**: 255-262
- GABRYS, B., TJALLINGII, W. F. (2002) **The role of sinigrin in host plant recognition by aphids during initial plant penetration**. Entomol. Exp. Appl., **104**: 89-93
- GALENSA, R., SCHÄFERS, F.-I. (1981) **Hochleistungs- und capillargaschromatographische Bestimmung von para-Hydroxybenzoesäureestern in Lebensmitteln mit komplexer Matrix**. Z. Lebensm. Unters. Forsch., **173**: 279-284
- GESHI, N., BRANDT, A. (1998) **Two jasmonate inducible myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* L. seedlings with homology to jacalin**. Planta, **204**: 295-304
- GIJZEN, M., MCGREGOR, I., SÉGUIN-SWARTZ (1989) **Glucosinolate uptake by developing rapeseed embryos**. Plant Physiol., **89**: 260-263

- GLAWISCHNIG, E., HANSEN, B. G., OLSEN C. E., HALKIER, B. A. (2004) **Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxim, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**: 8245-8250
- GLEN, D. M., JONES, H., FIELDSSEND, J. K. (1990) **Damage to oilseed rape seedlings by the field slug, *Deroceras reticulatum*, in relation to glucosinolate concentration**. Annal. Appl. Biol., **117**: 197-207
- GMELIN, R., VIRTANEN, A. I. (1959) **New type of enzymic cleavage of mustard oil glucosides. Formation of allyl thiocyanate in *Thlaspi arvense* and benzyl thiocyanate in *Lepidium ruderale* and *L. sativum***. Acta Chem. Scand., **13**: 1474-1475
- GRÄNICH, F., CHRISTEN, P., KAPETANIDIS, I. (1992) **High-yield production of valerporiates by hairy root cultures of *Valeriana officinalis* L. var. *sambucifolia***. Mikan. Plant Cell Rep., **11**: 339-342
- GRASER, G., OLDHAM, N. J., BROWN, P. D., TEMP, U., GERSHENZON, J. (2001) **The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana***. Phytochem., **57**: 23-32
- GRIFFITHS, D. W., BIRCH, A. N. E., HILLMANN, J. R. (1998) **Antinutritional compounds in the Brassicaceae: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects**. J. Hort. Sci. Biotech., **73**: 1-18
- GRIFFITHS, D. W., DEIGHTON, N., BIRCH, A. N. E., PATRIAN, B., BAUR, R., STÄDLER, E. (2001) **Identification of glucosinolates on the leaf surface of plants from the Cruciferae and other closely related species**. Phytochem., **57**: 693-700
- GROOTWASSINK, J. W. D., BALSEVICH, J.-J., KOLENOVSKY, A.D. (1990) **Formation of sulfatoglucosides from exogenous aldoximes in plant cell cultures and organs**. Plant Science (Shannon), **66** (1): 11-20
- GRUBB, C. D., ZIPP, B. J., LUDWIG-MÜLLER, J., MASUNO, M. N., MOLINSKI, T. F., ABEL, S. (2004) ***Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis**. Plant J., **40**: 893-908
- GRUNWALD, I., RUPPRECHT, I., SCHUSTER, G., KLOPPSTECH, K. (2003) **Identification of guttation fluid proteins: the presence of pathogenesis-related proteins in non-infected barley plants**. Physiol. Plantarum, **119**: 192-202
- HALBEISEN, T. (1954) **Über die unspezifische Reizkörperwirkung der Kapuzinerkresse**. Therapiewoche, **5**: 130-132
- HALKIER, B. A. (1999) **Glucosinolates**. In: Naturally Occuring Glucosides. (Hrsg. R. Ikan) Wiley & Sons, Chichester, UK: 193-223

- HALKIER, B. A., HANSEN, C. H., MIKKELSEN, M. D., NAUR, P., WITTSTOCK, U. (2002) **The role of cytochromes P450 in biosynthesis and evolution of glucosinolates**. In: Phytochemistry in the Genomics and Post-genomics Eras. /Hrsg. J. T. Romeo, R. A. Dixon) Elsevier, Amsterdam: 223-248
- HALKIER, B. A., GERSHENZON, J. (2006) **Biology and Biochemistry of Glucosinolates**. Annu. Rev. Plant Biol., 57: 303-333
- HALL, C., MCCALLUM D., PRESCOTT, A., MITHEN, R. (2001) **Biochemical genetics of glucosinolate modification in *Arabidopsis* and Brassica**. Theor. Appl. Genet., 102: 369-374
- HÄNSEL, R., KELLER, K., RIMPLER, H., SCHNEIDER, G. (Hrsg.) (1994) ***Tropaeolum*** (HN: 2013000). In Drogen P-Z. Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 1004-1013
- HANSEN, C. H., DU, L. C., NAUR, P., OLSEN, C. E., AXELSEN, K.B. et al. (2001) **CYP83B1 is the oxime-metabolizing enzyme in the glucosinolate pathway in *Arabidopsis***. J. Biol. Chem., 276: 24790-24796
- HARA, M., FUJII, Y., SASADA, Y., KUBOI, T. (2000) **cDNA cloning of radish (*Raphanus sativus*) myrosinases and tissue-specific expression in root**. Plant Cell Physiol., 41 (10): 1102-1109
- HARA, M., ETO, H., KUBOI, T. (2001) **Tissue printing for myrosinase activity in roots of turnip and Japanese radish and horseradish: a technique for localizing myrosinases**. Plant Sci., 160: 425-431
- HASEGAWA, T., YAMADA, K., KOSEMURA, S., YAMAMURA, S., HASEGAWA, K. (2000) **Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating substances of radish hypocotyls**. Phytochem., 54: 275-279
- HASLAM, R. P., DOWNIE, A. L., RAVETON, M. et al. (2003) **The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches**. Ann. appl. Biol., 143: 81-91
- HAWKES, C., COAKER, T. H. (1976) **Behavioural responses to host plant odours in adult cabbage root fly (*Erioischia brassicae* (Bouché))**. Symp. Biol. Hung., 16: 85-89
- HÖGLUND, A. S., LENMANN, A., FALK, A., RASK, L. (1991) **Distribution of myrosinase in rapeseed tissues**. Plant Physiol., 95: 213-221
- HOLST, B., WILLIAMSON, G. (2004) **A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds**. Nat. Prod. Rep., 21: 425-447
- HOOPER, L., CASSIDY, A. (2006) **A review of the health care potential of bioactive compounds**. J. Sci. Food Agric., 86: 1805-1813

- HULL, A. K., VIJ, R., CELENZA, J. L. (2000) ***Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**: 2379-2384
- HURTER, J., RAMP, T., PATRIAN, B. et. al. (1999) **Oviposition stimulants for the cabbage root fly: isolation from cabbage leaves.** Phytochem., **51**: 377-382
- HUSEBYE, H., SUPACHITRA, C., WINGE, P., THANGSTAD, O. P., BONES A. M. (2002) **Guard Cell- and Phloem Idioblast-Specific Expression of Thioglucoside Glucohydrolase 1 (Myrosinase) in *Arabidopsis*.** Plant Physiol., **128**: 1180-1188
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology: IUBMB Enzyme Nomenclature EC3.2.1.147. URL: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/147.html, letzter Zugriff: 25.03.2007
- IQBAL, M. C. M., MOELLERS, C. (2003) **Uptake and distribution of sinigrin in microspore derived embryos of *Brassica napus* L.** J. Plant Physiol., **160**: 961-966
- JÖRGENSEN, L. B. (1981) **Myrosin cells and dilated cisternae of the endoplasmic reticulum in the order Capparales.** Nord. J. Bot. **1**: 433-445
- JÖRGENSEN, L. B. (1995) **Stomatal myrosin cells in Caricaceae, Taxonomic implications for a glucosinolate-containing family.** Nord. J. Bot., **15** (5): 523-540
- KAWAKISHI, S., KANEKO, T. (1987) **Interaction of proteins with allyl isothiocyanate:** J. Agric. Food Chem., **35**: 85-88
- KELLY, P. J., BONES A., ROSSITER, J. T. (1998) **Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*.** Planta, **206**: 370-377
- KIRKEGAARD, J. A., MATTHIESSEN, J. N. (2006) **Biofumigation - the use of glucosinolate-containing plants for pest and disease control.** Abstract Band, The First International Conference on Glucosinolates: T 43
- KIRKLAND, D. F., MATSUO, M., UNDERHILL, E. W. (1971) **Detection of glucosinolates and myrosinase in plant tissue cultures.** Lloydia, **34**: 195-198
- KJAER, A., SCHUSTER, A., (1972a) **Glucosinolates in seeds of *Arabis hirsute* (L).** Acta Chem. Scand., **26**: 8-14
- KJAER, A., SCHUSTER, A., (1972b) **Glucosinolates in seeds of *Neslia paniculata*.** Phytochem., **11**: 3045-3048
- KLEINWÄCHTER, M., SELMAR, D. (2004) **A novel approach for reliable activity determination of ascorbic acid depending myrosinases.** J. Biochem. Biophys. Methods, **59**: 253-265

- KLEINWÄCHTER, M., KRAMER, D., SELMAR, D. et al. (2007) **Schlussbericht des FNR FV: 22018101. „Glucosinolat-reiche Kapuzinerkresse in der landwirtschaftlichen Nutzung: Entwicklung von *in vitro*-Vermehrungsverfahren zur Herstellung großer Mengen genetisch identischer *Tropaeolum majus*-Pflanzen mit hohem Gehalt an Glucosinolaten“**
- KLEMENT, Z. (1965) **Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluids merit as substrate for phyto bacterial pathogens.** *Phytopathology* **55**: 1033-1034
- KLIEBENSTEIN, D. J., LAMBRIX, V. M., REICHELT, M., GERSHENZON, J., MITCHELL-OLDS, T. (2001) **Gene duplication in the diversification of secondary metabolism: tandem 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases control glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*, **13**: 681-693
- KLIEBENSTEIN, D. J., FIGUTH, A., MITCHELL-OLDS, T. (2002) **Genetic architecture of plastic methyl jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*.** *Genetics*, **161**: 1685-1696
- Kommission E (1992) **Stoffcharakteristik: *Tropaeolum majus* (Kapuzinerkresse).** Bundesanzeiger
- KORITSAS, V. M., LEWIS, J. A., FENWICK, G. R. (1991) **Glucosinolate responses of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*).** *Ann. Appl. Biol.*, **118**: 209-221
- KOROLEVA O. A., DAVIES, A., DEEKEN, R. et al. (2000) **Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk.** *Plant Physiol.*, **124**: 599-608
- KURZHALS, C., GRÜTZMACHER, H., SELMAR, D., BIEHL, B. (1989) **Linustatin, the linamarin-glucoside protected against cleavage by apoplastic linamarase.** *Planta Med.*, **55**: 673
- LAHEE, ANGELA (2007) Raupen an Kapuzinerkresse. URL: www.schmetterling-raupe.de/, letzter Zugriff: 17.09.2007
- LEE, C.-J., SERIF, G. S. (1970) **Precursor role of [¹⁴C, ¹⁵N]-2-amino-6-(methylthio) caproic acid in progoitrin biosynthesis.** *Biochem.*, **9**: 2068-2071
- LENMANN, M., FALK, A., ROEDIN, J., HOEGLUND, A.-S., EK, B., RASK, L. (1993) **Differential expression of myrosinase gene families.** *Plant Physiol.*, **103**: 703-711
- LENMANN, M., ROEDIN, J., JOSEFSSON, L.-G., RASK, L. (1990) **Immunological characterization of rapeseed myrosinase.** *Eur. J. Biochem.*, **194**: 747-753

- LI, Y. C., KIDDLE, G., BENNETT, R., WALLSGROVE R. M. (1999) **Local and systemic changes in glucosinolates in Chinese and European cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) after inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot).** Ann. Appl. Biol., **134**: 45-58
- LIEBEREI, R. (1988) **Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing south american leaf blight.** J. Phytopathology, **122**: 54-67
- LÖNNERDAL, B., JANSON, J.-C. (1973) **Studies on myrosinases. II. Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed (*Brassica napus* L.)** Biochem. Biophys. Acta, **315**: 421-429
- LOHAUS, G., PENNEWISS, K., SATTELMACHER, B., HUSSMANN, M., MUEHLING, K. H. (2001) **Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species.** Physiol. Plantarum, **111**: 457-465
- LOUDA, S., MOLE, S. (1991) **Glucosinolates.** In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites. Vol. 1, The Chemical Participants. (Hrsg. G. A. Rosenthal and M. R. Berenbaum) Academic Press, London: 124-164
- LUDWIG-MÜLLER, J., RAUSCH, T., LANG, S., HILGENBERG, W. (1990) **Plasma membrane-bound high plant isoenzymes convert triptophan to indole-3-acetaldoxim.** Phytochem., **29**: 1397-1400
- LUDWIG-MÜLLER, J., SCHUBERT, B., PIEPER, K., IHMIG, S., HILGENBERG, W. (1997) **Glucosinolate content in susceptible and resistant Chinese cabbage varieties during development of clubroot disease.** Phytochem., **44**: 407-414
- LÜTHY, B., MATILE, P. (1984) **The mustard oil bomb: rectified analysis of the subcellular organization of the myrosinase system.** Biochem. Physiol. Pflanz., **179**: 5-12
- LUTHY, J., BENN, M. H., (1977) **Thiocyanate formation from glucosinolates: a study of the autolysis of allylglucosinolate in *Thlaspi arvense* L. seed flour extracts.** Can. J. Biochem., **55**: 1028-1031
- LYKKESFELDT, J., MÖLLER, B. L. (1993) **Synthesis of Benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L. Isothiocyanates as Potent Enzyme Inhibitors.** Plant. Physiol., **102**: 609-613
- MACGIBBON, D. B., BEUZENBERG, E., (1978) **Location of glucosinolase in *Brevicoryne brassicae* and *Lipaphis erysimi* (Aphididae).** NZ. J. Sci., **21**: 389-392
- MACURA, A. B., SEWERYN, A., HECZKO, P. B. (1980) **Therapeutic effect of benzylisothiocyanat on systemic candida infections in mice.** Drugs Exp. Clin. Res., **2**: 71-75

- MAGRATH, R., BANO F., PARKIN, I., SHARPE, A., LISTER, C., et al. (1994) **Genetics of aliphatic glucosinolates. I. Side chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*.** Heredity, **72**: 290-299
- MARI, M., LEONI, O., IORI, R., CEMBALI, T. (2002) **Antifungal vapour-phase activity of allyl isothiocyanate against *Penicillium expansum* on pears.** Plant Pathol., **51**: 231-236
- MASUDA, S., SAKUTA, C., SATOH, S. (1999) **cDNA cloning of a novel lectin-like xylem sap protein and its *root*-specific expression in cucumber.** Plant Cell Physiol., **40**: 1177-1181
- MATALLANA; L., KLEINWÄCHTER, M., SELMAR, D. (2006) **Sulfur is limiting the glucosinolate accumulation in nasturtium *in vitro* plants (*Tropaeolum majus* L.).** Journal of Applied Botany and Food Quality, **80**: 1-5
- MATILE, PH. (1980) **“Die Senfölbombe”: Zur Kompartimentierung des Myrosinasesystems.** Biochem. Physiol. Pflanzen, **175**: 722-731
- MCGREGOR, D. I., MULLIN, W. J., FENWICK, G. R. (1983) **Analytical methodology for determining glucosinolate composition and content.** J. AOAC, **66**: 825-849
- MENNICKE, W. H., GÖRLER, K., KRUMBIEGEL, G., LORENZ, D., RITTMANN, N. (1988) **Studies on the metabolism and excretion of benzyl isothiocyanate in man.** Xenobiotica, **18** (4): 441-447
- MERRITT, S. Z. (1996) **Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar, and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* (L.) Koch (Cruciferae).** J. Chem. Ecol., **22** (6): 1133-1145
- MIKKELSEN, M. D., NAUR, P., HALKIER, B. A. (2004) ***Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis.** Plant J., **37**: 770-777
- MIKKELSEN, M. D., PETERSEN, B. L., GLAWISCHNIG, E., JENSEN A. B., ANDREASSON, E., HALKIER, B. A. (2003) **Modulation of CYP79 genes and glucosinolate profiles in *Arabidopsis* by defence signaling pathways.** Plant Physiol., **131**: 298-308
- MILES, C. I., DEL CAMPO, M., RENWICK, J. A. A. (2005) **Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*.** J. Comp. Phys. A., **191**: 147-155
- MITHEN, R. F., DEKKER, M., VERKERK, R., RABOT, S., JOHNSON, I. T. (2000) **The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods.** J. Sci. Food Agric, **80**, 967-984

- MITHEN, R., FAULKNER, K., MAGRATH, R., ROSE, P., WILLIAMSON, G., MARQUEZ, J. (2003) **Development of Isothiocyanate-enriched broccoli, and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells.** Theor. Appl. Genet., **106**: 727-734
- MÖLLER, B. L., SEIGLER, D. S. (1998) **Biosynthesis of cyanogenic glycosides, cyanolipids and related compounds.** In: Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology (Hrsg. B. Singh) Decker, New York: 563-609
- MULCAHY, R. T., WARTMANN, M. A., BAILEY, H. H., GIPP, J. J. (1997) **Constitutive and β -naphthoflavone-induced expression of the human γ -glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE-sequence.** J. Biol. Chem., **272**: 7445-7454
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962) **Revised medium for growth and bioassay with tobacco tissue cultures.** Physiol. Plant., **15**: 473-497
- NORET, N., MEERTS, P., POSCHENRIEDER, C., BARCELO, J., ESCARRE, J. (2005) **Palatability of *Thlaspi caerulescens* for snails: influence of zinc and glucosinolates.** New Phytol. **165**: 763-772
- OGINSKY, E. L., STEIN, A. E., GREER, M. A. (1965) **Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by the conversion of progoitrin to goitrin.** Soc. Exp. Biol. Med. Proc., **119**: 360-364
- OHTSURU, M., HATA T. (1972) **Molecular properties of multiple forms of plant myrosinase.** Agric. Biol. Chem., **36**: 2495-2503
- OHTSURU, M., HATA T. (1973) **Studies on the activation mechanism of the myrosinase by L-ascorbic acid.** Agric. Biol. Chem., **37**: 1971-1972
- OHTSURU, M., KAWATANI, H. (1979) **Studies of the myrosinase from *Wasabi japonica*: Purification and some properties of Wasabi myrosinase.** Agric. Biol. Chem., **43**: 2249-2255
- OLDFIELD, M. F., BENNETT, R. N., KIDDLE, G., WALLSGROVE, R. M., BOTTING, N. P. (1999) **Biochemical characterization of an aldoxime-forming flavoprotein involved in 2-phenylethylglucosinolate biosynthesis in Brassica species.** Plant Physiol. Biochem., **37**: 99-108
- OLESZEK, W. (1995) **Glucosinolates: occurrence and ecological significance.** Wiadomosci Botaniczne, **39**: 49-58
- OLSEN, O., SÖRENSEN, H. (1981) **Recent advances in the analysis of glucosinolates.** J. Am. Oil Chem. Soc., **58**: 857-865

- PINTÁO, A. M., PAIS, M. S. S., COLEY, H., KELLAND, L. R., JUDSON, R. (1995) ***In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanat: a natural product from *Tropaeolum majus***. *Planta Med.*, **61**: 233-236
- PIOTROWSKI, M., SCHEMENEWITZ, A., LOPUKHINAT, A., MUELLER, A., JANOWITZ, T. et al. (2004) **Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure**. *J. Biol. Chem.*, **279**: 50717-50725
- POLLE, A., RENNENBERG H. (1993) **The significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress**. In: *Plant adaption to environmental stress*. (Hrsg. L. Fowden, T. A. Mansfield, J. Stoddart) Chapman and Hall, London, Glasgow, New York: 263-274
- PORTER, A. J. R., MORTON, A. M., KIDDLE, G., DOUGHTY, K. J., WALLSGROVE, R. M. (1991) **Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.), I. Effects of leave age and position**. *Ann. Appl. Biol.*, **118**: 461-467
- PRESCOTT, A. G., JOHN, P. (1996) **Dioxygenases-molecular structure and role in plant metabolism**. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **47**: 245-271
- RASK, L., ANDREASSON, E., EKBOM, B., ERIKSSON, S., PONTOPPIDAN, B., MEIJER, J. (2000) **Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae**. *Plant Mol. Biol.*, **42**: 93-113
- REESE, E. T., CLAPP, R. C., MANDELS, M. (1958) **A thioglucosidase in fungi**. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**: 228-242
- REIFENRATH, K., RIEDERER, M., MÜLLER, C. (2005) **Leaf surface wax layers of Brassicaceae lack feeding stimulants for *Phaedon cochleariae***. *Ent. Exp. Appl.*, **115**: 41-50
- RENWICK, J. A. A. (2006) **Tasting glucosinolates: some mysteries of plant-insect interactions**. Abstract Band, The First International Conference on Glucosinolates: T 31
- ROBIQUET, P. J., BOUTRON, F. (1831) **Sur la semence de moutarde**. *J. Pharm. Chim.*, **17**: 279-282
- RODMAN, J. E., PRICE, R. A., KAROL, K., CONTI, E., SYTSMA, K. J., Palmer, J. D. (1993) **Nucleotide sequences of the *rbcL* gene indicate monophyly of mustard oil plants**. *Ann. Miss. Bot. Gard.*, **80**: 686-699
- RODMAN, J. E., KAROL, K. G., PRICE, R. A., SYTSMA, K. J. (1996) **Molecules, morphology, and Dahlgrens expanded order Capparales**. *Syst. Bot.*, **21**: 289-307

- RODMAN, J. E., SOLTIS P. S., SOLTIS D. E., SYTSMA, K. J., KAROL, K. G. (1998) **Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies**. Am. J. Bot., **85**: 997-1006
- ROESSINGH, P., STÄDLER, E., FENWICK, G. R. et al. (1992) **Oviposition and tarsal chemoreceptors of the cabbage root fly are stimulated by glucosinolates and host plant extracts**. Entomol. exp. appl., **65**: 267-282
- ROGOZINSKA, J., DROZDOWSKA, L. (1981) **Glucosinolates in embryo, cotyledon and callus cultures of rape depending on external factors**. Fette Seifen Anstrichmittel, **11**: 439-442
- RONSE DECRAENE, L. P., SMETS, E. F. (2001) **Floral Developmental evidence for the systematic relationships of *Tropaeolum* (Tropaeolaceae)**. Annals of Botany, **88**: 879-892
- ROSSITER, J. T., JAMES, D. C., ATKINS, N. (1990) **Biosynthesis of 2-hydroxy-3-butenylglucosinolate in *Brassica napus***. Phytochem., **29**: 2509-2512
- SAARIVIRTA, M. (1973) **Formation of benzyl cyanide, benzyl thiocyanate, benzyle isothiocyanate and benzylamine from benzyl glucosinolate in *Lepidium***. Planta Med., **24**: 112-119
- SASAKI, S. (1963) **Inhibitory effects by α -naphthyl-isothiocyanate on development of hepatoma in rats treated with 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene**. J. Nara. Med. Assoc., **14**: 101-115
- SCHAFFER, R.-J. (1980) **Untersuchungen zur *in vitro*-Wirksamkeit von Benzylsenfölen gegen pathogene Bakterien und Sprosspilze**. Diss. Köln
- SCHARPENSEEL, H. W., ACEVEDO, R., ROCHA, A. B., RABANG, B. R. (1958) **Einiges über die Verteilungs- und Organaffinitätsstudien mit Radiopapain (S^{35}) und Radiotromalit (S^{35}), sowie die Behandlung von Geflügelvirkkrankheiten mit Papain und Antibiotika aus Blütenpflanzen**. Arch. Geflügelzucht Kleintierkunde, **7**
- SCHNUG, E. (1990) **Glucosinolates-Fundamental, environmental and agricultural aspects**. In: Sulfur nutrition and sulphur assimilation in higher plants.. (Hrsg. H. Rennenberg, C. Brunold, L. J. de Kok, I. Stulen), SPB Academic Publ., The Hague, The Netherlands: 97-106
- SEIDSCHECK, M. (2007a) Bundesverband der Arzneimittelhersteller e.V.
URL: www.bah-bonn.de/arzneimittel/index/.html, letzter Zugriff: 21.02.2007
- SEIDSCHECK, M. (2007b) Bundesverband der Arzneimittelhersteller e.V.
URL: www.bah-bonn.de/news/Naturheilmittel.pdf, letzter Zugriff: 21.02.2007

- SEIGLER, D. S. (1991) **Cyanide and cyanogenic glycosides**. In: Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Vol. 1, The Chemical Participants (Hrsg. G. A. Rosenthal, M. R. Berenbaum) Academic Press, San Diego: 35-77
- SELMAR, D. (1993) **Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by Hevea cotyledons**. *Planta*, **191**: 191-199
- SELMAR, D., IRANDOOST, Z., WRAY, V. (1996) **Dhurrin-6'-glucoside, a cyanogenic Diglucoside from *Sorghum bicolor***. *Phytochem.*, **43** (3): 569-572
- SELMAR, D. (1999) **Biosynthesis of cyanogenic glucosides, glucosinolates and nonprotein amino acids**. In: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. (Hrsg. M. Wink) CRC Press, Sheffield: 79-150
- SHANKS, J., MORGAN, J. (1999) **Plant "hairy root" culture**. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 151-155
- SHERSON, S. M., ALFORD, H. L., FORBES, S. M. et al. (2003) **Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis***. *J. Exp. Botany*, **54** (382): 525-531
- SHIKITA, M., FAHEY, J. W., TAMARA, R., GOLDEN, W., HOLTZCLAW, D., TALALAY, P. (1999) **An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings**. *Biochem. J.*, **341**: 725-732
- SIDRANSKY, N., ITO, N., VERNEY, E. (1966) **Influence of α -naphthyl-isothiocyanate on liver tumorigenesis in rats ingesting ethionine and N-2-fluorenylacetamide**. *J. Nat. Cancer. Inst.*, **37**: 677-686
- SMITH, M.-K., DREW, R. A. (1990) **Current Applications of tissue culture in plant propagation and improvement**. *Austral. J. Plant Physiol.*, **17** (3): 267-290
- SMITH, B., KIRKEGAARD, J.-A., HOWE, G. N. (2004) **Impacts of Brassica break-crops on soil biology and yield of following wheat crops**. *Austr. J. Agricult. Res.*, **55** (1): 1-11
- SMIRNOFF, N. (1996) **The function and metabolism of ascorbic acid in plants**. *Annals Botany*, **78**: 661-669
- SMIRNOFF, N., WHEELER, G.L., (2000) **Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function**. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **35** (4): 291-314
- SÖDING, H. (1941) **Über den Nachweis einer aus dem Interzellularraum von *Echeveria*-Blättern auswaschbaren bakteriziden Substanz**. *Ber. Dtsch. Ges.* **59**: 458-466
- SPRINGETT, M. B., ADAMS, J. B. (1989) **Properties of brussels sprouts thioglucosidase**. *Food Chem.* **33**: 173-186

- STÄDLER, E., ROESSINGH, P. (1991) **Perception of surface chemicals by feeding and ovipositioning insects.** in: International Symposium of Insect-Plant Relationships, Symposia Biologica Hungaria (Hrsg. T. Jermy, A. Szentesi) Akademiai Kiadó, Budapest, Hungary: 71-86
- STICKL, H. (1954) **Über eine antibiotisch wirksame Pflanzensubstanz.** Dtsch. Med. Wschr, **79**: 1722-1725
- STICKL, H. (1955) **Experimentelle und klinische Erfahrungen mit einem pflanzlichen, antimikrobisch wirkenden Mittel.** Therapiewoche, **5**: 128-130
- TAIPALESUU, J., FALK, A., RASK, L. (1996) **A wound- and methyl jasmonate-inducible transcript for a myrosinase-associated protein with similarities to an early nodulin.** Plant Physiol., **110**: 483-491
- TAIPALESUU, J., ERIKSSON, S., RASK, L. (1997) **The myrosinase-binding protein from *Brassica napus* seeds possesses lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart.** Eur. J. Biochem., **250**: 680-688
- TANI, N., OHTSURU, M., HATA, T. (1974) **Isolation of myrosinase producing microorganism.** Agric. Biol. Chem., **38**: 1617-1622
- TEXTOR, S., BARTRAM, S., KROYMANN, J., FALK, K. L., HICK, A., et al. (2004) **Biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*: recombinant expression and characterization of methylthioalkylmalate synthase, the condensing enzyme of the chain-elongation cycle.** Planta, **218**: 1026-1035
- TEXTOR S., KNOKE, B., SCHUSTER, S., DE KRAKER, J.- W., TOKUHISA, J. G., GERSHENZON, J. (2006) **MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis thaliana*.** Abstract Band, The First International Conference on Glucosinolates: T 7
- THANGSTAD, O. P., EVJEN, K., BONES A. M. (1991) **Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae.** Protoplasma, **161**: 85-93
- THANGSTAD, O. P., WINGE, P., HUSEBYE, H., BONES, A. (1993) **The myrosinase (thioglucoside glucohydrolase) gene family in Brassicaceae.** Plant Mol. Biol., **23** (3): 511-524
- THANGSTAD, O. P., BONES, A. M., HOLTAN, S., MOEN, L., ROSSITER, J. T. (2001) **Microautoradiographic localisation of a glucosinolate precursor to specific cells in *Brassica napus* L. embryos indicates a separate transport pathway into myrosin cells.** Planta, **213**: 207-213

- THANGSTAD, O. P., GILDE, B., SUPACHITRA, C. et al. (2004) **Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum***. Plant Mol. Biol., 54: 597-611
- THIES, W. (1988) **Isolation of sinigrin and glucotropaeolin from cruciferous seeds**. Fat Sci. Technol., 90: 311-314
- THORNALLEY, P. J. (2002) **Isothiocyanates: mechanism of cancer chemopreventive action**. Anti-Cancer Drugs, 13: 331-338
- TIERENS, K., THOMMA, B. P. H., BROUWER, M., SCHMIDT, J., KISTNER, K. et al. (2001) **Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens**. Plant Physiol. 125: 1688-1699
- TOLLSTEN, L., BERGSTRÖM, G. (1988) **Headspace volatiles of whole plants and macerated plant parts of *Brassica* and *Sinapis***. Phytochem., 27 (12): 4013-4018
- TOOKEY, H. L. (1973) **Crambe thioglucosidase-separation of a protein required for epithiobutane formation**. Abst. Pap. Am. Chem Soc., 231
- TOROSER, D., GRIFFITHS, H., WOOD, C., THOMAS, D. R. (1995) **Biosynthesis and partitioning of individual glucosinolates between pod walls and seeds and evidence for the occurrence of PAPS:desulphoglucosinolate sulphotransferase in seeds of oilseed rape (*Brassica napus* L.)** J. Exp. Bot., 46 (292): 1753-1760
- TURCSÁNYI, E., LYONS, T., PLÖCHL, M., BARNES, J. (2000) **Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.)**. J. Exp. Bot., 51 (346): 901-910
- ULMER, B., GILLIOTT, C., ERLANDSON, M. (2001) **Feeding preferences, growth, and development of *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) on Brassicaceae**. Can. Entomol., 133: 509-519
- UNDERHILL, E. W., WETTER, L. R., CHISHOLM, M. D. (1973) **Biosynthesis of glucosinolates**. Biochem. Soc. Symp., 38: 303-326
- VAN BEL, A. J. E., HESS, P. (2003) **Phloemtransport. Kollektiver Kraftakt zweier Exzentriker**. Biol. Unserer Zeit, 33 (4): 220-230
- VANETTEN, C. H., DAXENBICHLER, M. E., PETERS, J. E., TOOKEY, H. L. (1966) **Variation in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals**. J. Agric. Food Chem., 14, 426-430
- VERHOEVEN, D. T. H., VERHAGEN, H., GOLDBOHN, R. A., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN POPPEL, G. (1997) **A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables**. Chemico-Biol. Interact., 103: 79-129

- VIERHEILIG, H., BENNETT, R., KIDDLE, G. et al. (2000) **Difference in glucosinolate patterns and arbuscular mycorrhizal status of glucosinolate-containing plant species.** New Phytol. **129**: 343-352
- WEBER, G., OSWALD, S., ZÖLLNER, U. (1986) **Die Wirtseignung von Rapssorten unterschiedlichen Glucosinolatgehaltes für *Brevicoryne brassicae* (L.) und *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera, Aphididae).** Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz, **93**: 113-124
- WECHSELBERG, K. (1960) **Abschließende *in vitro*-Studien zur tuberkulostatischen Wirkung ätherischer Öle und verwandter Pflanzenwirkstoffe.** Z. Hygiene, **146**: 350-366
- WETTER, L. R., CHISHOLM, M. D. (1968) **Sources of sulfur in thioglucosides of various higher plants.** Can. J. Biochem., **46**: 931-935
- WIELANEK, M., URBANEK, H. (1999) **Glucotropaeolin and myrosinase production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **57**: 39-45
- WIELANEK, M., URBANEK, H. (2006) **Enhanced glucotropaeolin production in hairy root cultures of *Tropaeolum majus* L. by combining elicitation and precursor feeding.** Plant Cell Tiss. Organ. Cult., **86**: 177-186
- WILKINSON, A. P., RHODES, M. J. C., FENWICK, R. G. (1984) **Myrosinase activity of cruciferous vegetable.** J. Sci. Food Agric., **35**: 543-552
- WINTER, A. G. (1952) **Untersuchungen über die flüchtigen Antibiotika aus der Kapuziner- (*Tropaeolum majus*) und der Gartenkresse (*Lepidium sativum*) und ihr Verhalten im menschlichen Körper bei Aufnahme von Kapuziner- bzw. Gartenkressensalat per os.** Madaus Jahresbericht: 43-92
- WOLTERS, B., 1999: Amerikanische Arzneipflanzen in der spanischen Kolonialzeit 1492-1825.
URL: www.biblio.tu-bs.de/publikation/wolters/vortrag19990610.html
- XU, Z., ESCAMILLA-TREVINO, L.L., ZENG, L., LALGONDAR, M., BEVAN, D. R. et al. (2004) **Functional genomic analysis *Arabidopsis thaliana* glycoside hydrolase family 1.** Plant Mol. Biol., **55**: 343-367
- XUE, J. P., PIHLGREN, U., RASK, L. (1993) **Temporal, cell-specific, and tissue-preferential expression of myrosinase genes during embryo and seedling development in *Sinapis alba*.** Planta, **191**: 95-101
- XUE, J. P., JORGENSEN, M., PIHLGREN, U., RASK, L. (1995) **The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana* - gene organization, expression and evolution.** Plant Mol. Biol., **27**: 911-922

- YONEMITSU, H., SHIMOMURA, SATAKE, M. et al. (1990) **Lobeline production by *hairy root* culture of *Lobelia inflata* L.** Plant Cell Rep., **9**: 307-310
- ZENG, R. S., MALLIK, A. U., SETLIFF, E. (2003) **Growth stimulation of ectomycorrhizal fungi by *root* exsudates of Brassicaceae plants: Role of degraded compounds of indole glucosinolates.** J. Chem. Ecol., **29**: 1337-1355
- ZHANG, Y., TALALAY, P., CHO, C.-G., POSNER, G. H. (1992) **A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 2399-2403

Lebenslauf

Zur Person:

Name: Maik Uwe Kleinwächter
Geburtsdatum/-ort: 09.08.1974/Helmstedt
Familienstand: ledig

Promotion

05/2004-12/2007 Doktorarbeit am Institut für Pflanzenbiologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
05/2002-04/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pflanzenbiologie der TU Braunschweig

Hochschulstudium:

10/1996-04/2002 Studium der Biologie an der TU Braunschweig
Diplomarbeit: „Entwicklung einer zuverlässigen Methode zur Bestimmung und Charakterisierung der Myrosinase aus Blättern der Kapuzinerkresse *Tropaeolum majus*“

Wehr- / Zivildienst:

12/1994-12/1995 Zivildienst: Pflegedienst im Niedersächsischen Landeskrankenhaus (Königslutter am Elm)
10/1994-12/1994 Wehrdienst: Marinesicherung in Rostock

Schulausbildung:

1991-1994 Gymnasium am Bötschenberg, Helmstedt
Allgemeine Hochschulreife
1987-1991 Realschule Königslutter am Elm
1985-1987 Orientierungsstufe Königslutter am Elm
1981-1985 Grundschule Königslutter am Elm